جامعة دمشق – كلية العلوم
قسم علم الحياة الحيوانية

هيئة الطاقة الذرية السورية
قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير بعنوان

إنتاج الأضداد النانوية الموسومة لاستخدامها في تشخيص البروسيلا

Production of labeled nanobodies to use them in *Brucella* diagnosis

إعداد الطالبة
عبير يوسف الخضراوي

بإشراف

المشرف الرئيسي
أ.د. محمود قويدر

المشرف المشارك
د. أيمن المريري

التعاون العلمي
د. عبد القادر عبادي

لجنة الحكم:

الدكتور محمود قويدر	أستاذ في كلية العلوم بجامعة دمشق عضواً مشرفاً
الدكتورة سعاد العقلة	مدرسة في كلية العلوم بجامعة دمشق عضواً
الدكتور مازن صافي	باحث في هيئة الطاقة الذرية السورية عضواً

الإهداء

السلام عليكم ورحمة الله وبركاته

رسالتي هذه إنما أوجهها إلى قلبك المليء بكنوز الرحمة والحب، قلبك الذي أفاض عليَّ من معاني المحبة والإيثار ما تعجز عن مثله النفوس، قلبك الذي يكاد يطير فرحاً إذا رأيتَ ابتسامةً تداعب ثغري، ويكاد يتمزق حزناً إذا رأيتَ دمعة على خدي يا من تريد الخير لي وتريد أن تراني في أفضل مكانة وأسمى منزلة.

المربي الفاضل جدي العزيز

الحب الصادق، الشمس الوضاءة التي أنارت لي درب النجاح في الحياة، العيون التي سهرت الليالي تعمل دون كلل أو ملل دون تعب أو عجز، أجمل ما لفظته شفتاي، أغلى ما أملك في الوجود، نور عيوني وبهجة قلبي من تعبا من أجل توفير حياة كريمة لي ولأخوتي، بدعائكم كان النجاح وبرضاكم وصلت إلى هنا، جزاكم الله كل الخير ورفع قدركم في الدنيا والآخرة

والداي الحبيبان

إلى القلب الذي أرى فرحة الدنيا به، من أعيش له وبه، من أضاء عالمي، من يهمه استمرار نجاحي مددت لي يدك جسرا كي أعبر إلى مستقبلي.

خطيبي لؤي

إلى الذين ساندوني في كل مرحلة من مراحل رحلة الحياة. . إلى الذين زرعوا الأمل والبسمة في نفسي. . إلى الذين ملئوا حياتي سعادة وأنساً. . من كانت لهم أيدٍ بيضاء في حياتي.

إخوتي علا ورؤى وأقاربي

شكر وتقدير

...بسم الله الرحمن الرحيم...

اشكر الله عز وجل فهو غني عن شكري احمده رب العزة على كل ما انعم علي من نعم لا تعد ولا تحصى

فبعد حمد الله والثناء عليه

- أتوجه بالشكر الجزيل والامتنان إلى أعضاء لجنة الحكم. **الدكتور محمود قويدر، والدكتورة سعاد العقلة، والدكتور مازن صافي**. لتفضلهم بقراءة هذا البحث وإغنائهم بالملاحظات القيمة التي ستكون محل تقديري وعناية مني.

- عظيم الشكر للأستاذ الفاضل **محمود قويدر** الذي تفضل مشكوراً بالإشراف على هذا العمل ومنحه من وقته الكثير ومن خبرته فكان أستاذاً كبيراً اعتز به واعترف بفضله.

- تعجز الكلمات وتتوارى الحروف ويخجل القلم أن يقف هذا الموقف، فقد تخونه العبارات وتتشتت الجمل ويضيع المعنى، ولا يصل الهدف. و دائماً تكون سطور الشكر في غاية الصعوبة عند صياغتها لأنها تشعرنا دوماً بقصورها وعدم إيفائها حقك. أحكمت القيادة ونحن خلفك نحتمي بأفكارك، ونفتخر بشموخك الصامت، وعملك الدائب، ولا تجد منا إلا النداء باسمك وعدم الاستغناء عنك لتنقذنا من أخطائنا وتصحح هفواتنا كنت المنارة التي تضئ لنا طريق العلم والمعرفة لا أملك هنا إلا رفع يديّ لله والدعاء لك بطول العمر والصحة والعافية وفقك الله لما يحب ويرضى. **الدكتور أيمن المريري**

- لا تزال الكلمات تتزاحم وتتصارع بدأت طريقي باسمه فاخجلني بكرمه وأسعدني يا من بثقته فتحت لي باب العلم الكبير وكان همي الأكبر أن أكون عند حسن ظنك، من عطاءك ارتويت ومن علمك اغترفت أدعو الله أن يزيدك في الرفعة والسمو والعلو والمجد . **الدكتور عبد القادر عبادي**
- كما أتقدم بالشكر والعرفان بالجميل والتقدير لرمز التواضع والعطاء **الدكتور بسام البلعة**
- كما أتقدم بالشكر إلى رئيس قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية **الدكتور نزار مير علي**، على رحابة صدره وموافقته على قيامي بالعمل في مخبرات قسم التقانة الحيوية.
- أتقدم بالشكر والامتنان أيضاً إلى **الدكتور إبراهيم عثمان**، المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية، لاحتضانه للعلم والمعرفة، ولتفضله على الموافقة باستضافتي لإنجاز بحثي في مخبرات الهيئة وتقديم التسهيلات الممكنة.

- سمونا باغلى لغة في الدنيا ألا وهي لغة الاخوة الصادقة، قرأت في عينيك معنى النقاء والتقت روحي وروحك من قبل اللقاء سكبتي في قلبي كل حب وود وإخاء إلى من كانت لي الأمل، من كنت أتنفس من خلال وجودها في حياتي، أردت أن أكتب لها عبارات من ذهب، كلمات من عطور، وحروف من أزاهير الصباح الندية.

أختي وصديقتي الغالية علياء النعوفي

- يا من وجدت فيكم حسن الصداقة وطيب المعرفة وجميل الروح وعذب اللقاء تحتار كلماتي وتعجز عن التعبير عما بداخلي إلى صديقاتي **دانا زعيتر، دينا علي، لبنى عرابي، نور عيسى.**

- أهديكم كلمات مدادها دمع العيون، في الله أحببناكم، وعلى طريق العلم والخير عرفناكم، جمعنا بكم العلم والتعليم، قضينا معكم اجمل ايام العمر صديقاتي **جنى مير أسعد، غالية الحبال، رند عكل، سماح قاسم، آلاء سعيد، لبنى أبو عسلي، رزان الزيبق، أميمة تقي الدين، ولاء زيتون.**

- ولا يفوتني في هذه العُجالة تسجيل شكري للأخوة والأخوات من باحثين وأعضاء الهيئة الفنية والمخبرية في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات، قسم التقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية لما قدموه لي من مُساعدة، وأخص **بالذكر: الدكتور مازن صافي، الدكتور حسام حاج علي، نيرمين حاج محمود، رزان حمود، ليلى الحلاب، ليلى رمضان، أنس اللحام، منال حويجة، ربا عودة، ريما مكية، محمد صبرة، فواز الشولي، محمد سعيد، بشار رشود، حسام الدين خلف، غياث السويد، باسل عبيد، وليد ملوك، عبد الرحمن يوسف، ربيع زهيرة**. وكل العاملين في دائرة الصبغيات، وأخص منهم: **الدكتور وليد الأشقر، بثينة علي، ريم دودكي**.

- كما أشكر جميع الأساتذة في كلية العلوم، وأخص منهم في المقام الأول:

- **الأستاذ الدكتور عصام قاسم**، عميد كلية العلوم، جامعة دمشق.

- **الأستاذ الدكتور نديم مهنا**، وكيل الشؤون العلمية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

- **الأستاذ الدكتور منيف غريب**، رئيس قسم البيولوجيا الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

وختاماً أسأل الله العلي القدير أن يكون هذا العمل خالصاً لوجهه، وأن يجعله علماً نافعاً.

الفهرس

فهرس الأشكال

فهرس الجداول

ملخص

تعتبر تقنية الأضداد النانوية من طرائق البيولوجيا الجزيئية الحديثة التي تتم عبر الهندسة المورثية لنوع خاص من الأضداد التي توجد حصرياً عند عائلة الجمال، بحيث تتيح الحصول على جزيئات رابطة (Binders) صغيرة الحجم تُدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies) التي تمتاز بكونها عالية الثباتية والانحلالية وسهلة الإنتاج بطرائق التعبير المورثي في الإشريكية القولونية. تنتج هذه الأشكال الضدية على شكل مكتبة مورثية (Genetic library) عالية التنوع بحيث يتم غربلتها وعزل الأشكال الضدية الفعالة منها بتقنية الفاجات العارضة (Phage Display)، حيث تكون هذه الأشكال الضدية في مراحلها الأولى على شكل فاجات تعرض على سطحها الأضداد النانوية المختلفة.

لقد أجري هذا العمل على مكتبة مورثية للأضداد النانوية المنتجة من جمل ممنع بخلاصات بكتيرية للبروسيلا الضأنية، التي تنتمي لجنس البروسيلا الذي يعتبر عاملاً ممرضاً له أهمية خاصة بسبب آثاره الصحية على الإنسان والحيوان وبما يتسبب به من خسائر اقتصادية فادحة. لقد تم غربلة هذه المكتبة المورثية بصورة طرحية بخلاصات البروسيلا الضأنية ومن ثم ذاك الخاص باليرسينا ذات النمط المصلي O9 وذلك نظراً للشبه الكبير الذي تبديه مع البروسيلا، لنحصل بنتيجة ذلك على عدد من الفاجات العارضة لأضداد نانوية مختلفة ولكن نوعية للبروسيلا الضأنية. تم بعد ذلك إعادة تنسيل مورثات الأضداد النانوية المنتقاة في بلازميد التعبير البروتيني لنحصل بذلك على أربعة أضداد نانوية نقية و قادرة على تمييز البروسيلا الضأنية عن اليرسينيا من جهة وعن نوع البروسيلا المجهضة من جهة أخرى. كما تم في هذا العمل اختبار كفاءة وسم هذه الأضداد النانوية بالبيوتين باعتباره واحداً من أكثر أنظمة الكشف استخداماً في تفاعلات المقايسة المناعية الأنزيمية. يمكن لنتيجة هذا العمل أن تسهم بصورة فعالة في تطوير أطقم تشخيصية دقيقة وسريعة لتحديد نوع البروسيلا و للتمييز بين الإصابات بالبروسيلا واليرسينيا.

الكلمات المفتاحية:

الأضداد النانوية، الجمل، البروسيلا، اليرسينيا، الفاجات العارضة

Abstract

Nanobody technology is considered as recent molecular biology technique performed through the genetic engineering of special type of antibodies existing exclusively in *Camelidea*. It enables the obtaining of small binders, referred to as Nanobodies, conferred with high stability and solubility and are produced by gene expression system in *E. coli*. Nanobodies are extracted form gene library of high diversity, from which active binders are isolated by panning with phage display. In the early steps of this procedure, Nanobodies are present as displayed molecules on the surface of phages, or Nanobody-displaying phages (Nb-phages).

This work was established on Nanobody library previously created from Arabian camel immunized with *B. melitensis* antigens. It is a member of the genus *Brucella* which is considered as a very important infectious agent because of its impact on human and animal health with the concomitant economical loses. In this work, Nanobody library was subjected to a subtractive panning using *B. melitensis* total antigens after those from *Yersinia* serotype O:9 because of the apparent high similarity between these two types of bacteria. This resulted in four Brucella specific Nb-phages from which Nanobodes genes were isolated and recloned in protein expression plasmid. Purified Nanobodies were able not only to distinguish Brucella from Yersinia but also to differentiate between two important species of *Brucella*; *B. melitensis* and *B. abortus*. Although, in this work an attempt to label chemically our Nanobodies with biotin was achieved in order to evaluate the possibility of applying the biotin/extravidin system for Nanobody detection in ELISA tests. Results of this work could be invested in the development of precise and rapid diagnostic kits to discriminate between *Brucella* and *Yersinia* infections.

Keywords:

Nanobody, Camel, Brucella, Yersinia, Phage Display

اختصارات

APS	**Ammonium persulfate**	**امونيوم بيرسلفات**
B	***Brucella***	**البروسيلا**
BSA	**Bovine Serum Albumin**	**ألبومين مصل البقر**
CTAB	**Ctyle Trimityle Amino Bromide**	**ستيل ثلاثي متيل أمينو البرومايد**
E.coli	***Escherichia coli***	**الإشريكية القولونية**
EDTA	**Ethylene Diamine Tetra Acetic acid**	**ايتلين ثنائي الأمين رباعي حمض الخل**
ELISA	**Enzyme-Linked Immunosorbant Assay**	**المقايسة المناعية الأنزيمية**
DMSO	**Dimethyl sulfoxide**	**ثنائي متيل سلفوكسيد**
Fab	**Fragment-antigen binding**	**الشدفة الرابطة للمستضد**
FITC	**Fluorescein isothiocyanate**	**فلوروسين ايزو تيوسيانات الكبريت**
Hepes	**Hyroxy ethyl piperazine ethane sulfuric acid**	**هيدروكسيد ايتيل بيبيرازين ايتان حمض الكبريت**
IPTG	**Isopropylthio-D- galactoside**	**إيزوبروبيل تيو–يميني الغلاكتوزيد**
kDa	**Kilo Dalton**	**كيلو دالتون**
LPS	**Lipopolysaccharide**	**متعدد السكاريد الليبيدي**
OD	**Optical Density**	**الكثافة الضوئية**
PBS	**Phosphate Buffered Saline**	**محلول فوسفات الموقي الملحي**
PEG	**Polyethylene Glycol**	**غليكول عديد الاتيلين**
PCR	**Polymerase Chain Reaction**	**تفاعل السلسلي للبوليميراز**
PIK	**Protease Inhibitor Kocktail**	**مزيج تثبيط البروتياز**
PMSF	**Phenyl Methane Sulphonyl Fluoride**	**فينيل ميتان سلفونيل فلوريد**
SCFV	**single-chain fragment variable**	**الشدفة المتغيرة وحيدة السلسلة**
RPM	**Revolutions per minute**	**دورة في الدقيقة**
SDS	**Sodium Dodecyl Sulfate**	**سلفات دوديسيل الصوديوم**
SDS-PAGE	**SDS- Poly Acrylamyde Gel Elcetrophoresis**	**هلامة رحلان عديد الاكريلاميد**
TAE	**Tris Aetic EDTA**	**ثلاثي استيل الـ EDTA**
TEMED	**Tetramethylethylenediamine**	**رباعي متيل إيتيلين ثنائي الأمين**
TEA	**Triethylamine**	**ثلاثي ايتيل أمين**
TES	**Tris/ EDTA/ Sucrose**	**موقي يحتوي التريس/ EDTA / سكروز**
Th1	**Helper T-cell 1**	**الخلايا التائية المساعدة من النمط الأول**
TMB	**Tetra Methyl Benzidine**	**رباعي متيل البنزدين**
VHH	**Variable domain of Heavy-chain antibody**	**المنطقة المتغايرة للأضداد ذات السلسلة الثقيلة**
xg	**X Gravities**	**قوة الجاذبية**
Y	***Yersinia enterocolitica***	**اليرسينيا**

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

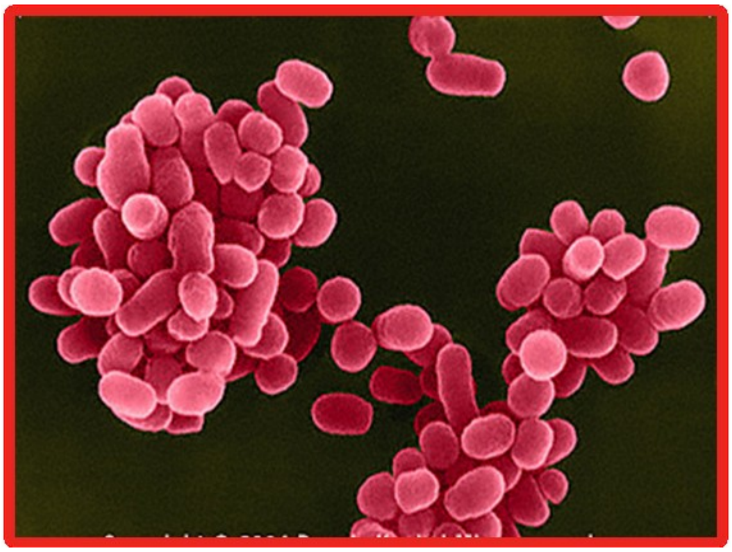
1. المقدمة: Introduction

1.1. داء البروسيلات (Brucellosis)

يعرف داء البروسيلات (Brucellosis) بالحمى المتموجة (Undulant fever) أو الحمى المالطية (Malta fever)، ويعد من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان (zoonotic diseases). حيث ينتشر في بلاد حوض البحر الأبيض المتوسط، شبه الجزيرة العربية، والقارة الهندية وبعض أجزاء المكسيك والأمريكيتين الوسطى والجنوبية (Boschiroli *et al*., 2001). وقد عُرف هذا المرض لأول مرة عند الإنسان في جزيرة مالطا بين الجنود البريطانيين بعد تناولهم حليب ماعز غير مغلي. ويرجع اكتشاف هذا المرض إلى الطبيب الإنجليزي ديفيد بروس (David Bruce) سنة 1878، حيث عزل البروسيلا الضأنية (*B. melitensis*) لأول مرة ومن هنا جاءت تسمية المرض. في عام 1897 قام العالم برنارد بانغ (Bang) بعزل البروسيلا المجهضة (*B. abortus*) من الأبقار المجهضة، ولذلك تم إطلاق اسم مرض بانغ (Baldwin *et al*., 1998) على الإصابات الناجمة عن البروسيلا المجهضة. يُسبب هذا المرض خسائر اقتصادية كبيرة ناجمة عن انخفاض أعداد قطعان الماشية بسبب الإجهاضات وموت الأجنة، انخفاض كميات الحليب، وارتفاع تكلفة علاج حالات احتباس المشيمة والتهاب الضرع، بالإضافة لخطورة هذا المرض على صحة الإنسان وسلامته (Ica *et al*., 2008).

1.1.1. العامل البكتيري المسبب للمرض

يسبب هذا المرض بكتيريا البروسيلا *Brucella* المصنفة مع عائلة الـ *Brucellaceae* والتي تأخذ شكل مكورات عصوية Coccobacilli صغيرة سالبة الغرام مفردة تتراوح بين 0.5 إلى 0.7 ميكرومتر. لا تمتلك محفظة خارجية ولا تُشكل أبواغ (الشكل 1). لهذه البكتيريا القدرة على الحركة بالرغم من عدم امتلاكها للسياط. وهي هوائية اختيارية، تنمو بدرجات حرارة تتراوح عادة بين الـ 20–40 ْم، تحتاج بعض السلالات إلى تركيز 5–10% من غاز الـ CO_2، درجة الحموضة (pH) المثلى لنموها: 6.6–7.4. تظهر مستعمرات البروسيلا بعد 3–4 أيام من استنباتها على وسط Brucella® agar، لكنها تظهر بعد 3–4 أسابيع من زراعة الدم، وإن إضافة المصل لوسط الاستنبات يُحسن ويُسرع من عملية النمو (Corbel, 1997).



(الشكل 1): الشكل العام للبروسيلا

صورة بالمجهر الالكتروني توضح الشكل العام الخارجي للبروسيلا التي تأخذ هيئة مكورة عصوية صغيرة سالبة غرام مفردة لا تمتلك سياط ولا محفظة خارجية.

يتبع لجنس البروسيلا عدد كبير من الأنواع التي تختلف فيما بينها بحسب مضيفها الطبيعي الجدول (1) (Moreno, 2002).

الجدول (1) أنواع البروسيلا

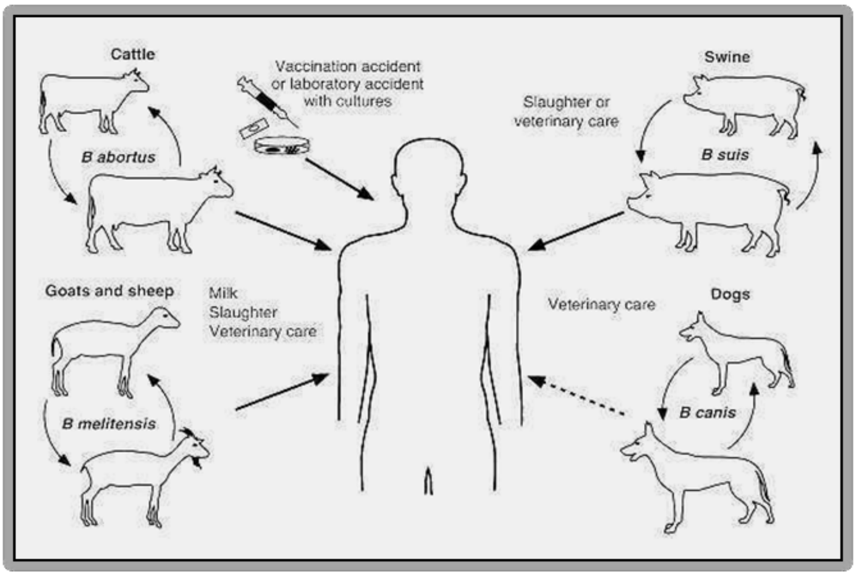
النوع	**المضيف**
البروسيلا الضأنية *B. melitensis*	الأغنام والماعز والجمال
البروسيلا المجهضة *B. abortus*	الأبقار
البروسيلا الخنزيرية *B. suis*	الخنازير
البروسيلا الكلبية *B. canis*	الكلاب
البروسيلا الماعزية *B. ovis*	الأغنام والماعز
البروسيلا الجرذية *B. neotomae*	جرذ الصحراء

تتميز البروسيلا الضأنية بأنها أشد فوعة مرضية على الإنسان، تليها البروسيلا الخنزيرية بينما تعتبر البروسيلا المُجهضة أخف فوعة من النوعين السابقين.

2.1.1. الوبائية (Eipdemiology)

يمكن للعدوى بالبروسيلا أن تحدث بعدة طرائق (الشكل 2):

- الاحتكاك المباشر بين الحيوانات الأهلية المصابة والمربين.
- تناول الحليب الملوث ومنتجاته الطازجة غير المعقمة.
- العاملين في مخابر علمية متخصصة بالبروسيلا قد يتعرضون للإصابة المهنية، وقد تكون إصابتهم في بعض الأحيان خطيرة.
- دخول البكتيريا المسببة للمرض عن طريق جرح أو تلوث غشاء ملتحمة العين عند التعرض لإفرازات حيوان مصاب وخصوصاً عند ذبحه أو إجهاضه.
- تنتقل العدوى للحيوان إما عن طريق التماس مع حيوان آخر مصاب أو تناول غذاء ملوث بالبكتيريا، أو دخول البكتيريا عن طريق العين أو الجلد (Al-Mariri *et al.*, 2001a; Refai, 2002).



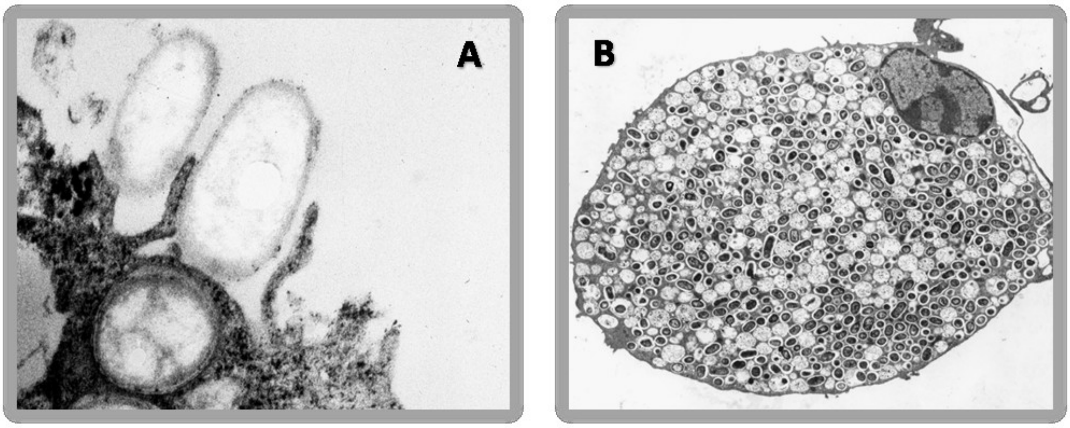
(الشكل 2): طرائق الإصابة بالبروسيلا

مخطط توضيحي يظهر طرائق العدوى بالبروسيلا حيث تنتقل بشكل أساسي من خلال تناول حليب ملوث أو الاحتكاك المباشر مع حيوان مصاب. بالإضافة إلى إمكانية انتقال العدوى من خلال المختبرات التحليلية التي تتعامع مع العينات الملوثة من حيوانات مصابة، أو المسالخ التي تذبح تلك الحيوانات.

تتراوح فترة حضانة المرض من أسبوع إلى ثلاثة أسابيع وتمتد أحياناً لعدة أشهر، يُعاني بعدها الإنسان المصاب من ارتفاع في درجة الحرارة مع تعرق شديد وخصوصاً في الليل (حمى غير منتظمة) ومن صداع وآلام الظهر، إضافة إلى نقصان في الوزن وتضخم في الكبد والطحال والعقد اللمفاوية عند تقدم المرض وإهمال العلاج (Almuneef and Memish, 2003; El Miedany *et al.*, 2003).

3.1.1. الاستجابة المناعية ضد البروسيلا

يشترك في الاستجابة المناعية ضد البروسيلا كلاً من المناعة الخلطية (Humoral immunity) والمناعة خلوية الوساطة (Cell Mediated Immunity) (Al-Mariri *et al.*, 2001b). ومن المعروف أن البروسيلا بكتيريا داخل خلوية اختيارية، تتوضع بشكل رئيسي في البالعات الكبيرة وحيدة النواة (monocyte-macrophage)، وتستطيع البروسيلا البقاء والتكاثر داخل هذه الخلايا (de Bagues *et al.*, 2005)، عبر كبح اندماج الجسيمات الداخلية (endosome) بالليزوزمات (lysosomes) (Celli *et al.*, 2003) (الشكل 3). يؤدي التوضع داخل الخلوي لهذه البكتيريا إلى تشكيل مناعة ضدها تتجلى بحدوث استجابة مناعية خلوية الوساطة من النمط Th1 (T helper 1) والتي تعتبر هامة جداً لضبط الخمج (Al-Mariri *et al.*, 2002)، وتتميز بقدرتها على إنتاج الانترفيرون غاما IFN-γ والأنترلوكينات وعامل النخر الورمي ألفا TNF-α. ويعتبر الإنتاج المبكر لهذه السيتوكينات هاماً في عملية الدفاع ضد البروسيلا (Al-Mariri *et al.*, 2001a).



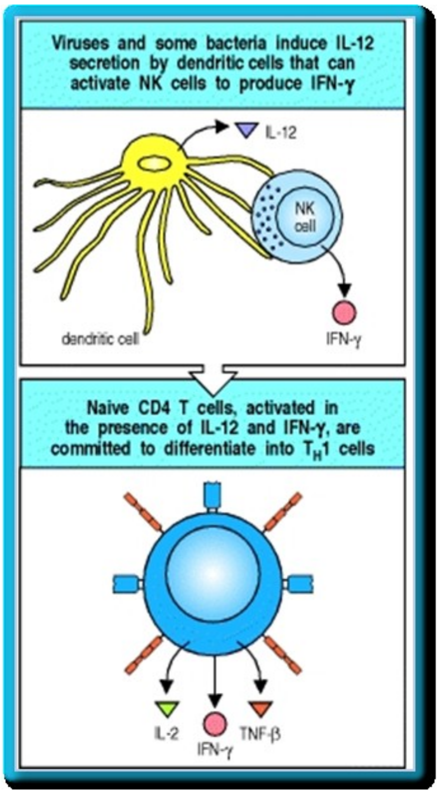
(الشكل 3): توضع البروسيلا داخل البالعات الكبيرة

صورة بالمجهر الالكتروني توضح غزو البروسيلا للبالعات الكبيرة (A) وتوضعها داخل البالعات بحيث تكون قادرة على البقاء والتكاثر ضمنها (B).

<u>الاستجابة خلوية الوساطة ضد البروسيلا</u>

عندما تغزو البروسيلا خلايا المضيف تتم بلعمتها من قبل البالعات الكبيرة (macrophage) فتشكل تفاعل التهابي موضعي يؤدي إلى تفعيل الخلايا التائية $CD4^+$ و$CD8^+$. بدايةً تُنتج الخلايا التائية $CD4^+$ الانترفيرون غاما الذي يحفز بدوره وظائف البالعات. تحلل الخلايا التائية $CD8^+$ النوعية للميكروب أي خلية مصابة بما فيها البالعات محررةً البكتيريا الداخل خلوية، وبالتالي تتم بلعمة وقتل البكتيريا المحررة من قبل البالعات السليمة والمنشطة بالانترفيرون غاما. تساهم أيضاً اللمفاويات التائية السامة للخلايا (CTL's) من النمط الظاهري $CD4^-$ و$CD8^+$ في الدفاع ضد البروسيلا الداخل خلوية (Kaufmann and Hess,

1999). يُعتبر الانترفيرون غاما من أهم المنتجات الرئيسية التي تنتج من قبل الـ Th1 والخلايا القتلة الطبيعية NK (Natural Killer) والذي يتم تنظيم إنتاجه من قبل الانترلوكين 12 (IL-12) الذي يفرز من قبل البالعات الكبيرة والخلايا المتغصنة (Zhan and Cheers, 1995) (الشكل 4).



(الشكل 4): طرائق تحفيز الخلايا التائية +CD4

تُحفز البكتيريا الداخل خلوية خلايا NK والخلايا المتغصنة لإنتاج الانترولوكين 12 والانترفيرون غاما اللذان يسهمان في تكاثر الخلايا التائية CD4 وتمايزها إلى Th1.

الاستجابة الخلطية ضد البروسيلا

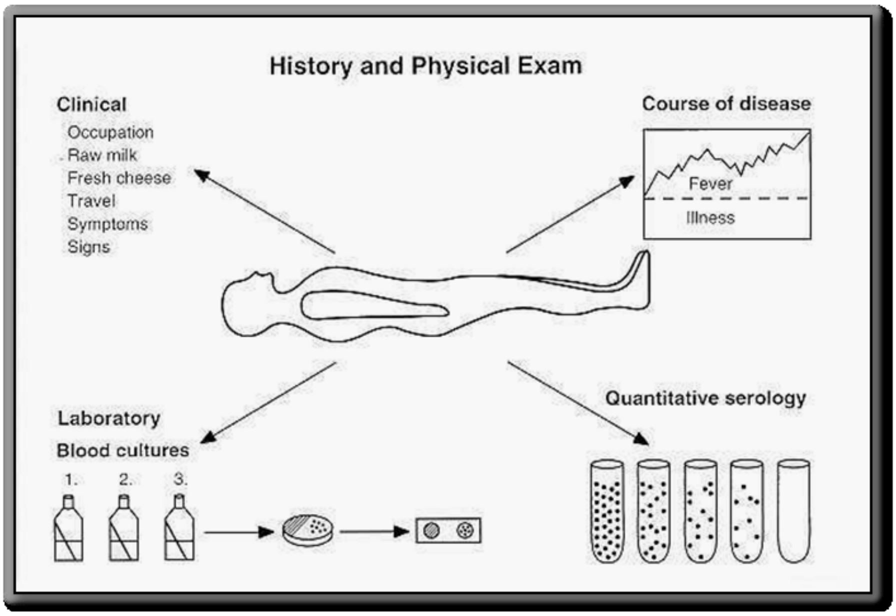
يتألف الغشاء الخارجي للبكتيريا من المستضدات الأساسية التي تشترك في تحفيز الاستجابة الخلطية ضد البروسيلا. وكبقية البكتيريا سالبة الغرام يتألف الغشاء الخارجي للبروسيلا الملساء من فوسفولبيدات (phospholipids) والبروتينات ومتعدد السكاريد اللبيدي الأملس (Smooth lipopolysaccharide-LPS). يساهم الـ S-LPS حيوياً في حماية بنية ووظيفة الغشاء الخارجي في البكتيريا ويعد عاملا أساسياً في تحفيز الجهاز المناعي على إنتاج الأضداد. يتألف الـ S-LPS من الداخل من جزء غليكولبيدي glycolipidic (لب قليل السكاريد oligosaccharide بالإضافة إلى اللبيد A) ومن الخارج من سلسلة عديد السكاريد polysaccharide (السلسلة O). يعتبر المستضد O المسؤول عن تحديد نوع المستعمرة ملساء أو خشنة، حيث إن المستعمرة الملساء تحتوي على هذا المستضد أما الخشنة فتفتقده (Naoufi *et al*., 2010).

يعد المستضد O من أهم المستضدات التي تحفز إنتاج الأضداد بما فيها الـ IgM والـ IgG، الهامين لحل البروسيلا من قبل جملة المتممة. حيث يتم إنتاج الـ IgM مباشرة بعد الإصابة لكن يتناقص إنتاجها مع ارتفاع مستوى الـ IgG. من ناحيةٍ أخرى فإن الاختبارات المصلية نحو متعدد السكاريد اللبيدي تعتبر غير نوعية ويمكن أن تسبب تفاعلات مصلية كاذبة مع عدد من الأنماط البكتيرية المشابهة (Nielsen, 2002).

بالإضافة للأضداد الموجهة لطبقة متعدد السكاريد اللبيدي، هناك عدد من البروتينات التي تحفز المناعة خلطية وخلوية الوساطة ومن أهمها بروتينات الغشاء الخارجي وبروتينات السيتوبلاسما الخارجية مثل الـ BCSP31 والـ BP26 (Mayfield *et al.*, 1988)، وأيضاً البروتينات السيتوبلاسمية التي من أهمها بروتينات الصدمة الحرارية (Hsp's) (Lin and Ficht, 1995)، بالإضافة إلى البروتينات الريبوزومية (ribosomal proteins) مثل P39 الذي يحفز تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة والخلايا التائية المساعدة من النمط الأول Th1 (Al-Mariri, 2010).

4.1.1. تشخيص الإصابة بالبروسيلا

يعتمد تشخيص البروسيلا على التاريخ المرضي شاملاً التعرض للحيوانات المصابة أو شرب حليب غير مغلي أو مبستر بالإضافة إلى وجود الأعراض. لكن التشخيص الأكيد يعتمد على عزل البروسيلا والفحص المجهري للبكتيريا، بالإضافة لزرع الدم والسائل الدماغي الشوكي على أوساط الاستنبات، لكن عملية حضن المستنبتات تحتاج لوقت طويل قد يستغرق عدة أسابيع تكون عندها البروسيلا قد تحولت للطور المزمن (الشكل 5) (Al-Attas *et al.*, 2000).



(الشكل 5): طرائق تشخيص البروسيلا

يوضح الشكل الطرائق المختلفة لتشخيص البروسيلا بما فيها من استعراض للتاريخ المرضي وظهور الأعراض بالإضافة إلى زراع الدم والاختبارات المصلية كتفاعل رايت وتفاعل وردية بنغال والترسيب المناعي.

وتبقى الاختبارات المصلية هي الاختبارات الشائعة لتشخيص البروسيلا عند الإنسان والحيوان، ويمكن تطبيقها على المصل أو الحليب باستخدام مستحضر مستضدي من البروسيلا المجهضة المقتولة تحت النوع 1 (سلالة ملساء)، ويمكننا بهذه الطريقة كشف الأضداد المضادة للـ LPS. ومن أهم هذه الاختبارات المصلية تفاعل رايت (Wright test) وتفاعل وردية بنغال (Rose Bengal) وتفاعل تثبيت المتممة والمقايسة المناعية الأنزيمية (Sirmatel *et al.*, 2002).

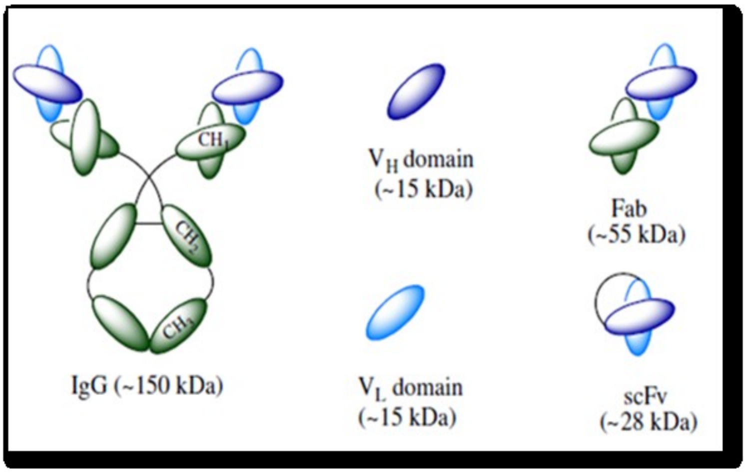
إنَّ حساسية ونوعية هذه التحاليل المصلية ضعيفة نسبياً، حيث لا تسمح بالتمييز بين الإصابات الحديثة والإصابات المزمنة. بالإضافة إلى المشكلة التشخيصية الأكبر وهي حدوث التفاعلات المصلية الكاذبة (Weynants *et al.*, 1996) والتي تعود لوجود تشابه بالمحددات المستضدية للـ LPS البروسيلا مع تلك التابعة لبكتيريا أخرى مثل الـ *Yersinia enterocolitica* O:9 (Al-Mariri *et al*., 2002). ولجعل التشخيص أكثر نوعية يجب التركيز على أضداد موجهة ضد بروتينات البروسيلا لاستخدامها كمستضدات في التشخيص المصلي للبروسيلا وإنتاج اللقاحات (Al-Mariri, 2008).

2.1. الأضداد

تدخل الأضداد (Antibodies) في صلب العديد من التطبيقات الحيوية بما فيها تشخيص ومعالجة العديد من الأمراض ومسبباتها، وقد تم إنتاج واستخدام العديد من الأضداد بطرائق مخبرية وفي مقدمتها الأضداد وحيدة النسيلة (monoclonal antibodies) (Davis, 2000)، حيث أحدثت تقنية الأضداد وحيدة النسيلة ثورة تطورية في مجال علاج العديد من الأمراض. على الرغم من أهمية هذه الأضداد إلا أنها من حيث البنية البروتينية تعتبر شديدة التعقيد وبالغة الهشاشة، فوفقاً للمعايير الجزيئية تعتبر الأضداد كبيرة الحجم، إذ يتكون كل ضد من سلسلتين ثقيلتين عديدتي الببتيد وسلسلتين خفيفتين، هذه السلاسل الأربع تنطوي على نفسها بشكل بالغ التعقيد وتتزين بسكريات مكمّلة (Burton and Woof, 1992). فالحجم الكبير لهذه الأضداد يجعلها تتفكك في درجات الحرارة المرتفعة ودرجات الحموضة (pH) المتطرفة، كما أن صلاحية هذه الأجسام تنتهي عادة في غضون أسابيع إن لم تكن مخزنة في درجات حرارة تقارب درجة التجمد. وهي أيضاً تُهْضَم بسرعة في الجهاز الهضمي، وتُمنع من دخول الدماغ وتبقى محجوزة في محيط الأورام الصلبة، وبذلك فإن كثيراً من التطبيقات الطبية والبحثية لا يمكن إجراؤها بالأضداد الوحيدة النسيلة (Saerens *et al.*, 2008).

في هذا الصدد، بدأ مهندسو البروتينات بإجراء التجارب على شُدَف (fragments) من الأضداد تم الحصول عليها عن طريق قطع جذع الضد الذي تأخذ بنيته شكل الحرف Y، أو عن طريق قطع الجذع وإحدى الذراعين، تاركين ذراعاً واحدة للقيام بالمهمة الكيميائية للضد. وعلى غرار الأضداد وحيدة النسيلة الكاملة الحجم تستطيع شُدَف الأضداد هذه والتي تلقب بالـ Fab (fragment-antigen binding) (Holliger and Hudson, 2005) أن تعالج الأمراض عن طريق الارتباط بالذيفانات أو العوامل الممرضة وتثبيطها (الشكل 6).

لقد قام الباحثون بالمزيد من تشذيب شدف الأضداد Fabs، بحيث لم تترك منها إلا ذروة واحدة من السلسلتين المكونتين لها والتي تدعى بالـ scFv تتألف هذه الشدفة من المنطقة المتغايرة للسلسلتين الثقيلة والخفيفة ويربط بينهما رابط متعدد الببتيد (Harmsen and De Haard, 2007). ترتبط هذه المنطقة بالمستضد بفاعلية كبيرة (الشكل. 6)، وبما أن هذه الأضداد مزدوجة السلسلة فهي تميل بطبيعتها للالتصاق ببعضها، ولذلك فإن شدفها تتكدس معاً داخل البكتيريا التي تصنعها، ويقلل تلاصق الجزيئات هذا من حصيلة إنتاجها كما يعيق أداء عملها (Muyldermans *et al.*, 2009).



(الشكل 6): استخدام تقنيات الهندسة الوراثية في تشذيب الأضداد.

مخطط تمثيلي يوضح الأضداد العادية التي تتألف من سلسلتين ثقيلتين وسلسلتين خفيفتين وباستخدام تقنيات الهندسة الوراثية يتم تشذيب الضد للحصول على الشدفة Fab (أعلى اليمين). قام الباحثون بالمزيد من تشذيب شدف الأضداد Fabs، بحيث لم تترك منها إلا ذروة واحدة من السلسلتين المكونتين لها والتي تدعى بالـscFv (أسفل اليمين).

بينما يواصل العلماء إعادة هندسة شدف الأضداد لحل هذه المشكلات تبين وجود بديل بالطبيعة. من عظمة الخالق تبين أن مصل الجمل يحوي نوعين من الأضداد، فبالإضافة إلى الأضداد العادية تبين وجود نوع آخر من الأضداد تدعى بالأضداد ذات السلسلة الثقيلة.

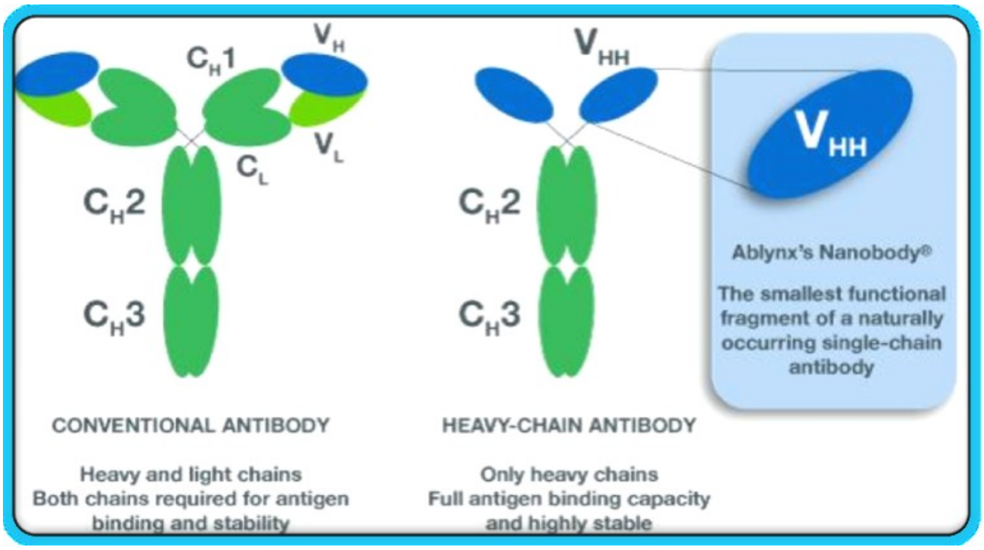
3.1. الأضداد النانوية (Nanobodies)

1.3.1. لمحة تاريخية:

في عام 1989 قام البروفيسور مويلديرمانس (Muyldermans) ضمن مجموعة من علماء الأحياء بقيادة البروفيسور هامرس (Hamers) من الجامعة الحرة ببروكسل بدراسة ملاحظة غريبة تم تقديمها كجزء من مشروع أعده أحد الطلبة حول الكيفية التي تحارب بها الجمال العربية (ذات السنام الواحد) والجواميس المائية الطفيليات. فقد بدا أن نتائج أحد الفحوص المخبرية التي أجريت على الأضداد في دم الجمل العربي خاطئة. فبالإضافة إلى الأضداد المعتادة ذات السلاسل الأربع، أشار الفحص إلى وجود أضداد أبسط منها تتكون من زوج من السلاسل الثقيلة فقط.

وبعد بضع سنوات من البحث، قام هامرس ومويلديرمانس بنشر اكتشافهم التصادفي في مجلة Nature عام 1993، حيث أظهرا أن نصف عدد الأضداد التي تدور في دم الجمال العربية Camelus (dromedarius) تفتقد للسلاسل الخفيفة، وكان ذلك مدعاة تسميتها بالأضداد ذات السلاسل الثقيلة، وتشارك الجمال العربية في هذه الخاصية جميع أفراد عائلة الجمال (*Camelidea*) ومنها الآسيوية ذات السنمين بالإضافة إلى حيوانات اللاما (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

لقد تمكن الباحثون باستخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية من عزل وإنتاج المنطقة الفعالة من السلسلة الثقيلة لهذه الأضداد والتي تدعى الـ VHH أو (الضد النانوي)، وهي عبارة عن بروتين صغير يبلغ وزنه 15 كيلودالتون وله القدرة الكاملة على الارتباط بمستضده النوعي بألفة عالية تساوي فعلياً إلفة أضداد كاملة تكبره بعشر مرات من حيث الحجم (الشكل 7) (Frenken *et al.*, 2000).



(الشكل 7): مقارنة بين أنواع الأضداد العادية والثقيلة السلسلة

الأضداد العادية عبارة عن بروتينات سكرية مؤلفة من تجمع لسلسلتين ثقيلتين وخفيفتين (إلى اليسار)، في حين أن الأضداد المميزة لعائلة الجمال تفتقد للسلسلتين الخفيفتين وتمتلك فقط سلاسل ثقيلة متطورة بحيث تؤمن بمفردها وظيفة الارتباط بالمستضد (في الوسط). تمكننا تقنيات الهندسة الوراثية من إنتاج المجال الفعال من السلاسل الثقيلة تلك، وهذا البروتين الصغير الناتج هو ما يطلق عليه اسم الضد النانوي أو (VHH) (إلى اليمين).

2.3.1. خصائص الأضداد النانوية

تمتاز الأضداد النانوية عن غيرها من الأضداد العادية بحجمها الصغير وبنيتها البروتينية المستقرة اللذان يعدان مصدر الكفاءة العالية، فهي قادرة على الالتصاق بأهداف مخفية كما هي الحال بالنسبة للمواقع الفعالة للأنزيمات (active sites) أو الصدوع في الأغشية الخلوية، الأمر الذي يستعصي في أغلب الأحيان على الأضداد العادية (Khalissa *et al.*, 2009).

وهي تمتاز أيضاً ببنيتها البروتينية المختزلة المحبة للماء والعالية الانحلالية والمقاومة للحرارة بما يسمح بحفظها في شروط عادية ولفترات طويلة. كما يمكنها أن تحتفظ بفعاليتها حتى في الشروط الفيزيولوجية القاسية، فهي تبقى قادرة على الارتباط بالمستضد في الأوساط المرجعة التي تتواجد داخل الخلايا الحية، وتمر بسهولة عبر الأغشية الخلوية وتصل لكل خلايا الجسم. من ناحية أخرى، يتخلل عملية إنتاج الأضداد النانوية مرحلة يتم فيها عزل الشدف المورثية المرمزة لكل منها بحيث تكون منسلة ضمن

بلازميدات أنظمة التعبير البروتيني في البكتيريا بما يسمح بإنتاج مستمر وثابت لأي من الأضداد النانوية ذات الفعالية والأهمية البحثية والتطبيقية (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997).

إن أهم ما يميز الأضداد النانوية هي السهولة النسبية التي يمكن من خلالها أن تقوم بضم بروتينات بعضها إلى بعض أو إلى أنواع مختلفة من المركبات. فقد قام العلماء بربط أضداد نانوية يصل عددها إلى أربعة، وذلك لتكوين تجمعات (متعددة التكافؤ) يكون باستطاعة الجزيء الواحد منها أن يرتبط بأكثر من نوع من المستضدات أو أن يرتبط بأحد مستضدين مختلفين أو بكليهما معاً (Desmyter *et al.*, 1996). وحديثاً قام فريق من العلماء بتصميم أضداد نانوية قادرة على استهداف نوع معين من البروتينات على سطح الخلايا السرطانية، مما يتيح توجيه أدق للمعالجة باتجاه الأنسجة الورمية تحديداً (Revets *et al.*, 2005).

3.3.1. إنتاج الأضداد النانوية المأشوبة

أصبحت طرائق تنسيل الشدف الرابطة للمستضد المعزولة من الحيوانات المُمَنعة في بلازميدات الفاجات العارضة (Phage Display) وانتقاء النسائل النوعية للمستضد من الوسائل الروتينية في العقد الأخير بغية انتقاء الجزيئات النوعية للمستضد (Muyldermans *et al.*, 2001; Revets *et al.*, 2005).

حالياً بالإمكان تنسيل شدف الأضداد النانوية مباشرة بعزل الخلايا البائية النوعية للمستضد الهدف، حيث تُحَضر مكتبات cDNA باستخلاص الـmRNA من الخلايا اللمفاوية المعزولة من دم جمل مُمنع بالمستضد الهدف (Ryckaert *et al.*, 2009). ويتم تحويله إلى الـcDNA بعملية النسخ العكسي بوساطة التفاعل السلسلي للبوليميراز RT-PCR وبوجود مرئسات تتثبت على تسلسلات محافظة مشتركة بين جميع مورثات الأضداد النانوية وتحصر بينها تسلسلات متباينة تختلف بحسب الضد وهي ما يحدد هوية كل ضد ونوعيته (Conrath *et al.*, 2001). يتم تنقية شدف الأضداد النانوية ويعاد تضخيمها بوجود مرئسات تحتوي مواقع أنزيمات التقييد من أجل مراحل التنسيل (Saerens *et al.*, 2004) يتم بعد ذلك تنسيل شدف مورثات الأضداد النانوية في نواقل بلازميدات ومن ثم إدخالها ضمن بكتيريا للحصول على عدد كبير من المستعمرات البكتيرية الحاوية على الذخيرة الوراثية للمواقع الرابطة للمستضد الهدف وهو ما يعرف بالمكتبة المورثية للأضداد النانوية (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997) (الشكل 8).

بالإمكان مسح مكونات المكتبات المورثية للأضداد النانوية لإيجاد الأشكال الفعالة منها والنوعية للمستضد إما بالفحص المباشر للمستعمرات أو بالغربلة حيث يتم اصطفاء الأشكال الضدية الفعالة وعزلها بصورة نوعية من هذه المكتبات باستخدام تقنية الفاجات العارضة (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997;

(Cortez-Retamozo *et al.*, 2004; Muyldermans *et al.*, 2001 وتعتبر الغربلة عن طريق الفاج العارض من أفضل الطرق لتحديد الارتباطات النوعية حيث تسمح بتحديد الارتباطات بإلفه عالية.



(الشكل 8): إنشاء المكتبات المورثية للأضداد النانوية

مخطط توضيحي يظهر طريقة إنشاء وانتقاء المكتبات المورثية للاضداد النانوية من جمل ممنع بالمستضد الهدف.

4.3.1. تقنية الفاج العارض

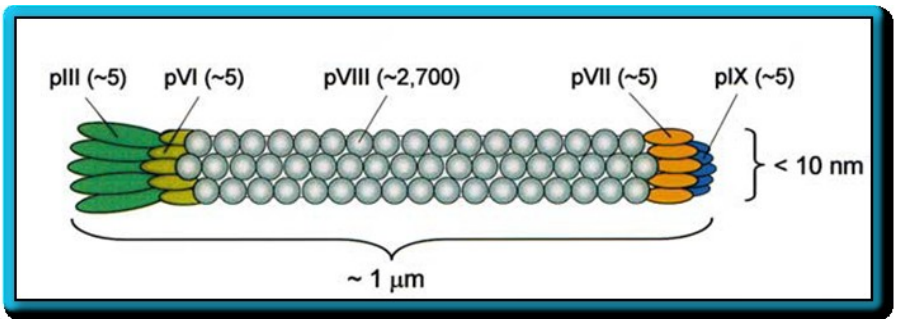
تعد تقنية الفاج العارض (phage display) من التقنيات الحديثة التي تعتمد اسلوب عرض الببتيدات والبروتينات المدروسة على سطح الفاجات وذلك بغية دراستها و تحديد ارتباطاتها النوعية. اكتشفت هذه الطريقة عام 1985 لعرض الببتيدات على سطح الفاج الخيطي M13، وحالياً كل أنواع تسلسلات البروتين والببتيد تعرض بنجاح على سطح الفاجات (Davis, 2000; Scott and Smith, 1990; Smith and Scott, 1993). وهناك مكتبات من سلاسل ببتيدية عشوائية متوفرة تجارياً وممكن أن تستخدم للحصول على ببتيدات مرتبطة لأي ربيطة.

تمتعت هذه التقنية بنجاح في حقول اكتشاف وهندسة الأضداد (Soderlind *et al.*, 2001)، بالإضافة

لأنها تقنية سهلة للإنتاج فهي تحدد وبدقة عالية الأضداد ومعيناتها المستضدية. تزود هذه التقنية بطرائق لتطوير الأدوات الجزيئية المستقبلية.

تستخدم الفاجات العارضة للببتيدات المؤشبة مكتبات الـ cDNA حالياً لدراسة تفاعلات بروتين– بروتين (Dowd *et al.*, 2001)، ولتحديد أهداف الأدوية ولتوثيق تفاعلات هدف – دواء (Lohse and Wright, 2001; Rodi *et al.*, 2002).

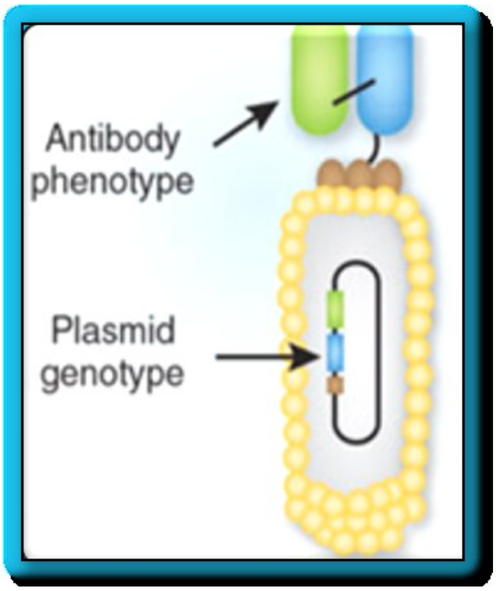
يعتبر الفاج الخيطي M13 الأكثر شيوعاً واستخداماً لعرض الببتيدات والبروتينات. يحتوي هذا الفاج على DNA حلقي أحادي السلسلة مغلف بغطاء أسطواني مكون من عدة بروتينات. يحمل جينوم الفاج 11 مورثة (تسمى من I إلى XI) ترمز 11 بروتين وظيفي (من gpI إلى gpXI)، يعتبر الـ pVIII بروتين الغطاء الرئيسي بينما pIII و pVI و pVII و pIX بروتينات الغطاء الثانوية، ويتم عادةً عرض الببتيدات على البروتين pIII أو pVIII (Russel, 1995; Russel *et al.*, 1997) (الشكل 9).



(الشكل 9): بنية الغطاء للفاج M13

يظهر الشكل بروتينات الغطاء للفاج pIII و pVI و pVII و pVIII و pIX، ويتم عادة عرض الببتيدات على البروتين pIII أو pVIII.

تنتج قوة هذه التقنية من حقيقة الارتباطات الفيزيائية المباشرة بين الببتيد أو البروتين المعروض على سطح الفاج والـDNA المرمز لذلك الببتيد الموجود ضمن المادة الوراثية لهذا الفاج. فمن أجل العرض على سطح الفاج يتم دمج تسلسل الـ DNA المرمز للبروتين المراد عرضه بجوار المنطقة المرمزة للنهاية الأمينية لبروتين الغطاء، وبالتالي يتم التعبير عن البروتين على سطح الفاج (Gupta *et al.*, 1999) (الشكل 10).



(الشكل 10): عرض الببتيدات على سطح الفاج

يظهر الشكل الضد المعروض على سطح الفاج الخيطي والمدمج مع بروتين الغطاء (النمط الظاهري)، حيث يحوي الفاج على مورثة الضد بجوار مورثة الغطاء (النمط المورثي).

وبنتيجة ذلك يتم الحصول على مكتبات فاجية (Phage display libraries)، تعتبر هذه المكتبات خليط متباين من الفاجات، يحوي كل فاج على DNA مدخل (DNA insert) مختلف عن الآخر لذلك سيعرض كل منها على سطحه ببتيدات مختلفة ووحيدة (Smith and Petrenko, 1997).

5.3.1. تطبيقات الأضداد النانوية

تعد الأضداد النانوية من الأدوات الجزيئية الواعدة في العديد من التطبيقات البيولوجية والطبية (Revets et al., 2005). فقد تم علاج العديد من الأمراض بالأضداد النانوية، وهذه الأضداد إما أن تستخدم كأدوات لاستهداف الأنزيمات أو لإعاقة التفاعلات الجزيئية النوعية. على سبيل المثال تم علاج مرض النوم الذي يسببه طفيلي التريبانوزوما (*trypanosome*) بالأضداد النانوية، حيث ترتبط هذه الأضداد بالغطاء البروتيني للتريبانوزوما وتنصهر بأنزيم البروتين الشحمي L-1 (ApoLI enzyme) فيؤدي ذلك إلى تحلل التريبانوزوما (Baral *et al.*, 2006; Stijlemans *et al.*, 2004).

ونظراً لمقاومة الأضداد النانوية لتغيرات درجة الحموضة وقدرتها على ربط المستضد بوجود تراكيز عالية من عوامل chaotropic توجهت الأنظار لاستخدامها في العلاج المناعي عن طريق الفم (Dumoulin *et al.*, 2002; Dumoulin *et al.*, 2003). فقد نجحت الأضداد النانوية على خفض معدلات الاعتلال والإسهال التي يسببها فيروس الروتا (rotavirus) في المسالك المعوية للفئران (van der Vaart *et al.*, 2006).

وفي علم الأورام تم توجيه الأضداد النانوية نحو مستضدات السرطان المُضغي (carcinoembryonic).

فيؤدي إلى دمج أنزيم البيتا لاكتاماز (β-lactamase) بالخلايا السرطانية، يقوم هذا الأنزيم بتحويل طليعة الدواء غير السامة المحقونة إلى دواء سام بالقرب من الخلايا السرطانية المستهدفة مما يؤدي إلى قتلها (Cortez-Retamozo *et al.*, 2004).

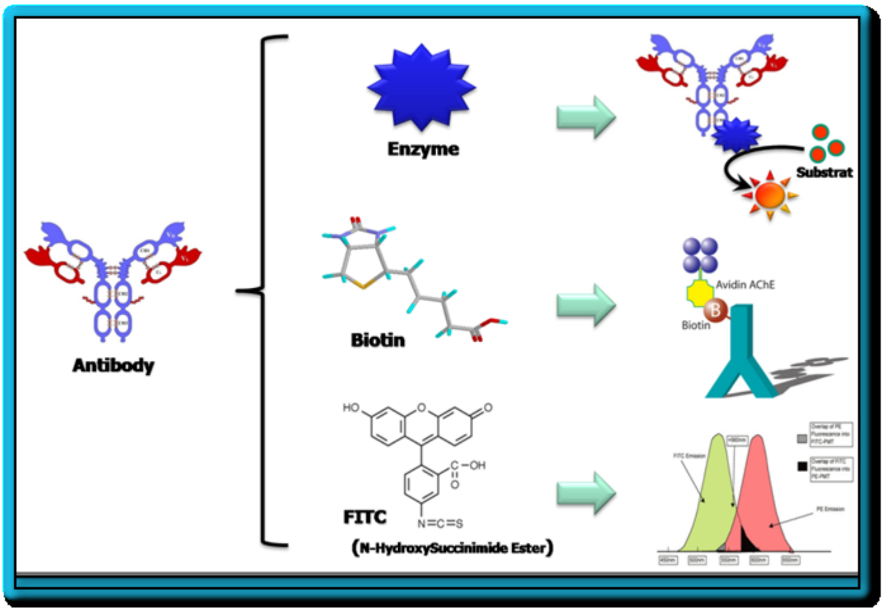
ويمكن استخدام الأضداد النانوية لمعالجة الأورام الصلبة (solid tumors) حيث ترتبط بمستقبلات عامل النمو البشري (EGFR) فتمنعه من الارتباط بمستقبله (Roovers *et al.*, 2007). وأيضاً تستخدم لمعالجة مرض الالتهاب الرثياني ومرض كرون (Crohn) حيث ترتبط بعامل النخر الورمي ألفا (tumor necrosis factor_α) فتعيق ارتباطه بمستقبله على سطح الخلية (Maass *et al.*, 2007).

بالإضافة إلى تطبيقات الأضداد النانوية في معالجة السرطان، فهي تستخدم في الاختبارات التشخيصية للسرطان. على سبيل المثال، للكشف المبكر عن سرطان البروستات لا بد من كشف مستضداته النوعية التي تدور في الدم، تمتلك هذه المستضدات عدة أشكال مختلفة لنفس البروتين (isoforms) وقد أنتجت أضداد نانوية قادرة على التمييز بين الأشكال المختلفة لهذه المستضدات في الدم (Saerens *et al.*, 2004).

يمكن ربط الأضداد النانوية بواسمات تمكنها من كشف وتتبع العديد من المستضدات الممرضة داخل الأجسام الحية. ومن هذا المنطلق تعد تقنية الأضداد النانوية من أفضل الطرق لإنتاج الواسمات المختلفة.

6.3.1. وسم الأضداد

يمكن للأضداد أن ترتبط بمركبات كيميائية بما فيها الكواشف اللونية، من دون تدمير قدرة هذه الأضداد على الارتباط بفعالية مع المستضد النوعي لها (Mellors, 1968). تعتبر الأضداد الموسومة الكواشف الرئيسية في العديد من التطبيقات ولاسيما المناعية وكشف المستضدات في المقاطع النسيجية والتبصيم المناعي (Wisdom, 1994). يتم وسم الأضداد إما بمادة كيميائية كالبيوتين أو أنزيمات مثل ألكالين فوسفاتاز أو بمادة متفلورة مثل الفلوروسين (fluorescent) (الشكل 11).



(الشكل 11): طريقة وسم الأضداد

مخطط توضيحي يظهر كيفية وسم الأضداد والتي يمكن أن توسم إما بالأنزيمات و يكشف عنها باستخدام المداد المناسب للأنزيم، أو بمادة كيميائية مثل البيوتين والذي يعتبر ذو ألفة عالية للـ avidin، أو بمادة متفلورة مثل الـ FITC ويكشف عنها بالأشعة فوق البنفسجية.

يعتبر وسم الأضداد بالبيوتين من أسهل وأسرع الطرق. يعرف البيوتين بالفيتامين B7 وهو عبارة عن جزيئة صغيرة تستطيع الارتباط بالبروتينات من دون أن تؤثر على خصائصها البيولوجية. يرتبط البيوتين بإلفة عالية مع الأفيدين avidin/streptavidin، تستخدم الأضداد الموسومة بالبيوتين عادةً في المقايسة المناعية الأنزيمية والتبصيم المناعي وكروماتوغرافيا الإلفة (Warren *et al.*, 2005). يوفر نظام بيوتين/أفيدين حساسية كبيرة و Background منخفضة. ونظراً للروابط العالية الإلفة فإنها تقلل من التفاعلات غير النوعية مع البروتينات الأخرى و تستطيع الكشف عن كميات ضئيلة من المستضدات.

أهداف البحث:

بالنظر لكافة المزايا التي تتمتع بها الأضداد النانوية فقد تمت أمثلة تقانة الأضداد النانوية في مخابر قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية، وكانت بداياتها من خلال مشروع إنتاج أضداد نانوية نوعية للبروسيلا لأغراض تشخيصية وبحثية بما قد يؤدي مستقبلا لاستثمارها في تطوير لقاحات أو أساليب علاجية ناجعة للبروسيلا (Abbady *et al*، قيد النشر). في هذا العمل سنحاول باستخدام تقنية الأضداد النانوية استهداف وكشف مستضدات نوعية من البروسيلا بحيث نستثمرها في التشخيص الدقيق حيث ستستخدم مكتبة مورثية عالية التنوع تم تحضيرها انطلاقاً من جمل ممنع بالبروسيلا الضأنية. وسوف يتم اصطفاء الأشكال الضدية الفعالة وعزلها بصورة نوعية من هذه المكتبة باستخدام تقنية الفاجات العارضة، ومن ثم تنقية هذه الأضداد وربطها بمادة واسمة لاستخدامها في العمليات البحثية والتطبيقية.

الفصل الثاني

مواد وطرائق البحث

Material and Methods

2. مواد وطرائق البحث

1.2. السلالات البكتيرية والبلازميدات والمرئسات المستخدمة:

1.1.2. السلالات البكتيرية:

أُستخدمت بكتيريا البروسيلا الضأنية *B. melitensis* 16M والبروسيلا المجهضة *B.abortus* واليرسينيا ذات النمط المصلي O9 *Y.enterocolitica* كسُلالات من أجل استحصال الخلاصة البروتينة، بينما أُستخدمت السلالة البكتيرية *Escherichia coli* TG1 كمضيف للبلازميد pHEN4 ولإنتاج الفاج M13 وكسلالة مضيفة لإحداث الإصابة الفاجية، كما واستخدمت السلالة *E.coli* WK6 كسُلالة مُضيفة للتنسيل والتعبير البروتيني لمورثات الأضداد النانوية، حيث يُظهر الجدول (2) خصائص السلالات المُستخدمة في هذا البحث.

الجدول (2): صفات وخصائص السلالات البكتيرية المستخدمة في هذا البحث

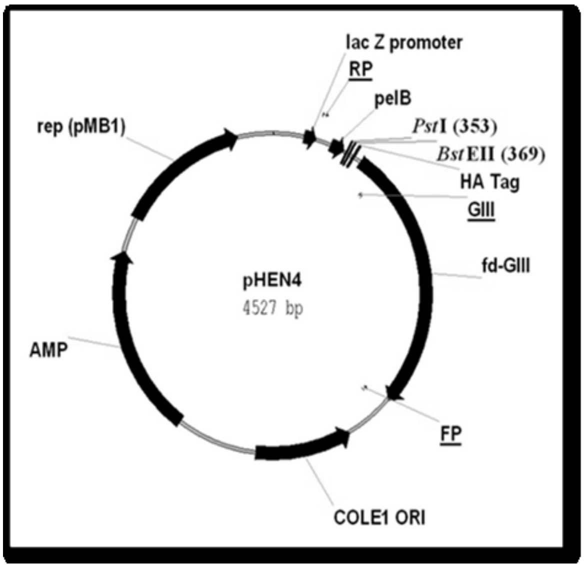
Source المصدر	**and Genotype Features** الصفات والطراز الجينومي	**Strains** السلالة
Lab stock goat isolate	two chromosomes of 1.17 and 2.1 Mb, with the same G + C content encoding 3,197 ORF.	***B. melitensis* 16M**
Lab stock	two circular DNA chromosomes of 1.17 and 2.1 Mb, The genome has a GC content of 57%, and 81% of the genome is a coding region.	***B. abortus***
Lab stock	circular DNA chromosome of 4,61bp. The number of coding sequences (CDSs) is 4037 with 7 rRNA operons and 81 tRNA. The GC content of the chromosome is 47.27%.	***Y .enterocolitica* O9**
Stratagene	(*supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)* F’ [*traD36 proAB+lacIq lacZΔM15*])	***E.coli* TG1**
Lab VIB, Brussels,Belgium	*Δ*(*lac-proAB*) *galE strA nalr* [F' *traD36 lacIq lacZΔM15 proAB*+])	***E.coli* WK6**

2.1.2. البلازميدات المستخدمة:

البلازميد pHEN4:

استخدام بلازميد التنسيل pHEN4 (Lab VIB, Brussels,Belgium) من أجل تنسيل مورثات الأضداد النانوية ضمن بكتيريا الـ *E.coli* TG1 (الشكل 12). من أهم الصفات التي يتميز بها هذا البلازميد:

- مُحضض الـ Lac-Z: الذي يعمل ضمن البكتيريا ويحض على انتساخ المورثة.
- مورثة مقاومة للأمبسليين ampicillin resistant gene: تُساعد على انتقاء المستعمرات الايجابية الحاوية على البلازميد ضمن أوساط الزرع الحاوية على الصاد الحيوي.
- التسلسل الإشاري Signal PelB: يعمل على إفراز البروتين في الوسط المحيط (periplasm).
- تسلسل مورثة الغطاء GIII: والتي تساعد على عرض الضد النانوي على سطح الفاج M13.
- واسمة HA: التي تقع بين مورثة الغطاء ومورثة الضد النانوي والتي تُساعد في كشف الضد النانوي باستخدام الضد النوعي للواسمة anti-HA في تقنيات المقايسة والتبصيم المناعيين.
- أصل التضاعف Origin replication: تُمكِّن البلازميد من التضاعف ضمن الـ *E.coli*.
- مواقع أنزيمي التقييد الـ BsteII/PstI التي باستخدامها يمكن قطع مورثات الأضداد النانوية من أجل تنسيلها في بلازميدات أخرى.



(الشكل 12): الخريطة المورثية للبلازميد pHEN4.

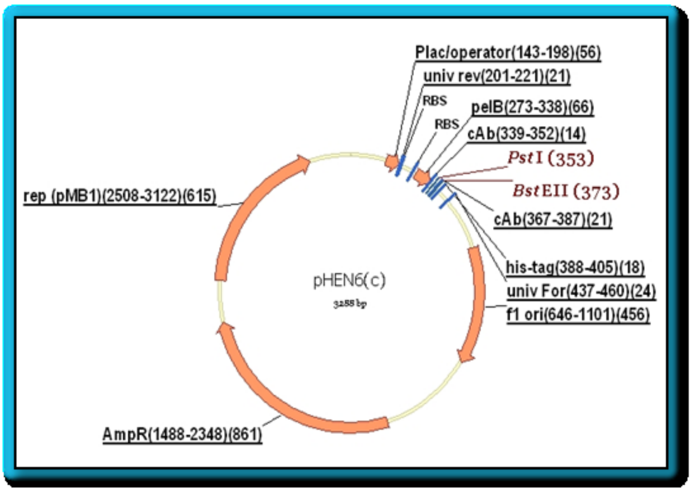
مخطط توضيحي يظهر الخريطة المورثية للبلازميد pHEN4 حيث نلاحظ موقع المحضض Lac-z والتسلسل الاشاري ولاحقة HA بالإضافة إلى موقع مورثة الغطاء GIII والمورثة المقاومة للأمبسيلين.

البلازميد pHEN6:

تم استخدام بلازميد pHEN6 وهو بلازميد مشتق من pHEN4 من أجل التنسيل والتعبير البروتيني لمورثات الأضداد النانوية ضمن بكتيريا الـ *E.coli* wk6 (الشكل 13). من أهم الصفات التي يتميز بها البلازميد:

- مُحضض الـ P Lac: الذي يعمل ضمن البكتيريا ويحض على انتساخ المورثة.
- التسلسل الإشاري Signal PelB: يعمل على إفراز البروتين في الوسط المحيط (periplasm).

- مورثة مقاومة للأمبسليين ampicillin resistant gene: تُساعد على انتقاء المستعمرات الايجابية الحاوية على البلازميد ضمن أوساط الزرع الحاوية على الصاد الحيوي.
- واسمة الهيستيدين Histidine tag: تُساعد في تنقية البروتين المأشوب وكشفه بالضد النوعي للهسيتدين anti-His في تقنيات المقايسة والتبصيم المناعيين.
- أصل التضاعف Origin replication: تُمكِّن البلاسميد من التضاعف ضمن الـ E.coli.
- مواقع أنزيمي التقييد الـ BsteII/PstI التي باستخدامها يمكن تنسيل مورثات الأضداد النانوية في البلازميد.



(الشكل 13): الخريطة المورثية للبلازميد pHEN6.

مخطط توضيحي يظهر الخريطة المورثية للبلازميد pHEN6 حيث نلاحظ موقع المحضض PLac والتسلسل الاشاري ولاحقة الهسيتدين بالإضافة إلى موقع المورثة المقاومة للأمبسلين.

3.1.2. المرئسات المستخدمة:

تم استخدم مزيج من المُرئسات النوعية لجنس البروسيلا لاستخدامها في تفاعل الـ PCR متعدد الشدف للتأكد من نقاوة السلالات المستخدمة في البحث وتبعيتها لجنس البروسيلا بنوعيها الضأنية والمجهضة، حيث تم تصميم هذه المرئسات وامثلتها في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية بالاعتماد على التسلسل النيكليوتيدي لمورثات البروسيلا بنوعيها الضأنية والمجهضة والمأخوذة من البنك الجينومي للبروسيلا (التسلسل النيكلوتيدي لهذه المرئسات قيد النشر).

وقد استخدمت المرئستين الموجهة RP والعكسية GIII للتأكد من صحة أطوال مورثات الأضداد النانوية المنتقاة بعد عملية الغربلة، وأيضاً استخدمت المرئستين الموجهة RP والعكسية Fb للتأكد من احتواء المستعمرات البكتيرية على التراكيب البلازميدية بعد عملية التحوير البكتيري الجدول (3).

الجدول (3): التسلسل النيكلونيدي للمرئسات المستخدمة

الاسم	الطول	التسلسل النيكلوتييدي
Rb	22	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
Fb	24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
GIII	19	CCACAGACAGCCCTCATAG

2.2. استنبات السلالات البكتيرية

تم استنبات سلالات من البروسيلا الضأنية والمجهضة وسلالة من اليرسينيا التي تم استخدامها كشاهد سلبي. جميع هذه السلالات تمت تنميتها على أطباق الزرع الصلبة 2YT (يحوي في كل ليتر 10 غرام Yeast Extract و16 غرام Trypton و5 غرام NaCl و15 غرام آغار بدرجة حموضة معتدلة)، وبعد نموها نقلت مستعمرات مفردة منها إلى دوارق الأوساط السائلة التي تحوي في كل ليتر29 غرام من 2YT و25 مل مصل الحصان وتم حضنها في الدرجة 37°م. وعند انتهاء فترة الحضن، تم ترسيب البكتيريا من الوسط السائل بالتثفيل ومن ثم غسلها مرتين بالمحلول الملحي الفوسفاتي PBS تمهيداً لاستخدامها في المراحل اللاحقة.

3.2. تحديد نقاوة السلالات البكتيرية باستخدام التفاعل السلسلي البوليميرازي

عُزل الـ DNA الجينومي من البكتيريا المغسولة بالـ PBS بطريقة CTAB/NaCl ومن ثم حُدد تركيزه بجهاز Nanodrop (Thermo®)، بغية استخدامه في نوع خاص من تفاعلات الـ PCR يدعى بتفاعل الـ PCR متعدد الشدف (Multiplex PCR) بغرض التأكد من سلالات البروسيلا المستخدمة.

1.3.2. استخلاص الدنا البكتيري الجينومي بطريقة (CTAB/NaCl)

<u>**المحاليل المستخدمة:**</u>

- موقي TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).
- SDS (w/v).
- بروتيناز K 20 mg/ml، 5M NaCl.
- محلول CTAB/NaCl (يحل 4.1 غ من NaCl في 70 مل ماء مقطر ثم يضاف CTAB ببطء مع التحريك والتسخين، يتم إكمال الحجم للـ 100 مل بالماء المقطر).
- مزيج كلوروفورم: كحول ايزواميل بنسبة 1:24.

- مزيج فينول: كلوروفورم: كحول ايزواميل بنسبة 1:24:25.
- ايزوبروبانول، إيتانول.

طريقة العمل:

- تثقيل 1 مل من المستنبت البكتيري لمدة دقيقتين بالسرعة القصوى.
- تعليق الراسب البكتيري بـ 567 µl من موقي TE ويمزج جيداً.
- إضافة 30 µl من 10% SDS ويمزج.
- إضافة 3 µl من بروتيناز K، ثم يحضن لمدة ساعة بالدرجة 37ْ م مع المزج بجهاز الرجاج الكهربائي (Eppendorf®).
- إضافة 100 µl من NaCl ويمزج جيداً.
- إضافة 80 µl من محلول CTAB/NaCl، ثم حضن لمدة 10 دقائق بالدرجة 65ْ م بجهاز الرجاج الكهربائي.
- إضافة حجم مماثل (بحدود 780 µl) من مزيج كلوروفورم: كحول ايزواميل 1:24 ويمزج جيداً، ثم يثقل لمدة 5 دقائق بالسرعة القصوى بعدها ينقل الطافي لأنبوب جديد.
- إضافة حجم مماثل (~600 µl) من مزيج فينول: كلوروفورم: كحول ايزواميل1:24:25، ثم تثقل لمدة 5 دقائق بالسرعة القصوى ثم ينقل الطافي لأنبوب جديد.
- إضافة 0.6 من الحجم من ايزوبروبانول (بحدود ~300 µl) ويمزج جيداً حتى يترسب الـ DNA.
- تثقيل لمدة 5 دقائق ثم التخلص من الطافي وغسل الأنبوب بـ 1 مل من إيتانول % 70، ثم تثقيل لمدة 5 دقائق ويتم التخلص من الطافي.
- التجفيف بالدرجة 45ْ م لمدة 10 دقائق بجهاز التخلية speed vac (Eppendorf®)، ثم يُعلق الراسب بـ 100 µl من محلول TE.
- تقرء تراكيز الـ DNA بواسطة جهاز المطيافية الـ Nanodrop.

2.3.2. تضخيم الدنا الجينومي بوساطة تفاعل الـ PCR

صمم تفاعل الـ PCR متعدد الشدف لتحديد تبعية البكتيريا المختبرة لجنس البروسيلا والتمييز بين نوعيها المجهضة والضأنية، حيث يستخدم لهذه الغاية عدة مرئسات نوعية لمورثات محافظة في جنس البروسيلا ومميزة لكلا نوعيها.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- موقي 10x: (200 mM Tris – HCL pH 8.8, 100 mM KCL, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1µg/µl BSA, 1% Triton).
- 50 mM MgSO4.
- أنزيم Taq بوليميراز (5u/µl).
- مرئسات نوعية بتركيز (5 pmole/µl).
- ماء مقطر معقم ddH_2O.

<u>طريقة العمل:</u>

- ضم أنبوب تفاعل الـ PCR (ذات السعة 200 µl) المكونات التالية الجدول (4):

الجدول (4): المواد الداخلة في تفاعل الـ PCR

المواد	حجم التفاعل 25 µl	
موقي بتركيز 10x	µl	2.5
MgSO4 (50 mM)	µl	1.5
نكليوتيدات/dNTPs	µl	1
مزيج من المرئسات (10 mM)	µl	2
DNA البروسيلا واليرسينيا (200ng)	µl	2
أنزيم تاك البوليميراز	µl	0.2
ماء معقم مقطر ليصبح الحجم	µl	25

- وضع الأنابيب بجهاز الـ PCR وتشغيل الجهاز حسب البرنامج التالي الجدول (5):

الجدول (5): برنامج الـ PCR.

البرنامج	درجة الحرارة	الزمن
البداية	95°C	5 min
عدد الدورات	35	دورة
التمسخ	94°C	15 sec
التشافع	58°C	30 sec
الاستطالة	72°C	45 sec
نهاية الاستطالة	72°C	10 min

3.3.2. الرحلان الكهربائي للدنا عبر هلامة الأغاروز:

بعد الانتهاء من تفاعل الـ PCR تُحضر عينات الـ DNA بإضافة موقي التهيئة ومن ثم ترحل عبر هلامة الأغاروز المحضرة بنسبة 1.5%، حيث تنفصل شدف الـ DNA وفقاً لحجمها.

المحاليل المستخدمة:

- موقي الترحيل TAE 50X: (2 M Tris, 57.1 ml acetate, 0.1 mM EDTA).
- صبغة ايتيديوم بروميد Ethidium Bromide (1 mg/ml).
- هلامة أغاروز بنسبة 1.5%.
- موقي تحضير العينات 6x (Loding Buffer): (xylene cyanol 0.10 %, bromophenyl blue 0.10%, Glycerol 60 % , 50mM Tris-HCl pH 7.6)

طريقة العمل:

- وزن 1.5 غ من الأغاروز ويكمل الحجم إلى 100 مل بموقي الترحيل ويسخن المزيج حتى الغليان.
- يبرد المحلول للدرجة 50-60°م ثم يصب في قالب الهلامة.
- إضافة نقطتين (~100 µl) من الايتيديوم برومايد (1 mg/ml) إلى محلول الأغاروز في القالب، يحرك المزيج جيداً ثم يثبت المشط.
- تترك الهلامة لتتصلب مدة 30 دقيقة، بعدها تزال الأمشاط ويثبت القالب في مقره ضمن جهاز الرحلان.
- إضافة موقي الترحيل إلى حوض الجهاز حتى تمام تغطية هلامة الأغاروز.
- تُحضر عينات الـ DNA الناتجة من تفاعل الـ PCR، حيث يضاف لكل عينة سدس حجمها من موقي

تحضير العينات (بحدود 5µl لكل أنبوب تفاعل بلمرة) وتحرك جيداً.

- تُصب العينات ضمن الآبار (15µl – 10) ويشغل الجهاز بفولطية 100-85 ولمدة 30–60 دقيقة.
- فحص الهلامة باستعمال الأشعة فوق البنسفجية حيث تظهر الأحماض النووية كحزم برتقالية يمكن تصويرها.

4.2. عزل بروتينات البروسيلا واليرسينيا

يتم تحضير الخلاصات البروتينية للخلايا من السلالات البكتيرية المختلفة باستخدام الموقي الفوسفاتي الملحي الحاوي على مادة الغوانيدين (Guanidine-HCl)، وأيضاً باستخدام الموقي الحال بدون غوانيدين (Lysis buffer)، كما وقد تم عزل بروتينات الغشاء الخارجي للبروسيلا الضأنية.

1.4.2. تحضير الخلاصات البروتينية من البكتيريا

المحاليل المستخدمة:

- Lysis buffer 2 X (50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH 7.6).
- 10 mg/ml Lysozyme stock.
- 25 X Protease inhibitor Kocktail (PIK).
- 100 mM (PMSF).
- 6 M Guanidine hudrochloride (Gu-HCl).
- 2% Sodium lauryl sacrosine.

طريقة العمل:

- تثفيل البكتيريا المغسولة بالـ PBS سابقاً بسرعة 6000 xg مدة 10 دقائق.
- التخلص من الطافي ويجفف الأنبوب بقلبه على ورق نشاف، قسم الراسب إلى أنبوبين.
- إضافة الحجم المطلوب من الموقي الحال الحاوي على غوانيدين GU-Lysis buffer للأنبوب الأول (يتم حساب الكمية المطلوبة عن طريق حساب الوزن الرطب، حيث يوزن الأنبوب قبل إضافة البكتيريا ومن ثم يوزن بعد التثفيل والتخلص من الطافي ويحسب الفرق، بحيث يضاف لكل واحد غرام من البكتيريا 5 مل من Lysis buffer)، وإضافة الموقي الحال بدون غوانيدين للأنبوب الثاني.
- يعاد تعليق البكتيريا (في الأنبوبين) بوساطة جهاز تحطيم الخلايا Sonnicater (Lab Sonic®) مدة 15 ثانية، ثم تحضن الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة مع الرج مدة 30 دقيقة.
- إجراء Sonnication حسب البرنامج التالي (Time 2 min, Pluse 15/45, Ampli 40%) ضمن الثلج

(من الأنبوب الأول يؤخذ جزء من البكتيريا لعزل بروتينات الغشاء الخارجي).

- تثقيل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm بالدرجة 4°م ثم نقل الطافي لأنبوب جديد، وإضافة نفس الحجم من GU-Lysis buffer للراسب البكتيري في الأنبوب الأول ونفس الحجم من الموقي الحال في الأنبوب الثاني.
- إعادة الخطوتين الأخيرتين مرة أو مرتين حتى الحصول على طافي نقي.
- جمع الطافي بأنبوب واحد ثم تثقيل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm بدرجة 4°م.
- نقل الطافي لأنبوب جديد، ثم قياس تركيز البروتين باستخدام طريقة برادفورد Bradford.
- **<u>يتم عزل بروتينات الغشاء الخارجي حسب البروتوكول التالي:</u>**
- يتم تثقيل الأنبوب الحاوي على البكتيريا مدة 15 دقيقة وبسرعة 6000 xg ويعاد تعليق الراسب بالموقي الحال الحاوي على غوانيدين.
- نقل 8 مل من العينة الى أنابيب فائقة التثقيل ويتم التثقيل بالسرعة الفائقة 40,000 xg ولمدة 30 دقيقة.
- تعليق الراسب بالموقي الحال الحاوي على 2% من Sodium lauryl sacrosine، وتعلق البكتيريا بوساطة جهاز تحطيم الخلايا Sonnicater مدة 15 ثانية وتحضن بالدرجة 37 °م مدة 30 دقيقة.
- تجمع بروتينات الغشاء الخارجي بالتثقيل الفائق بالسرعة 40,000 xg مدة 30 دقيقة.
- يغسل الراسب مرتين بالموقي الحال والتثقيل بسرعة 40,000 xg مدة 10 دقائق.
- يعاد تعليق الراسب بالماء المقطر ويقاس تركيز البروتين.

2.4.2. قياس تركيز المحتوى البروتيني في الخلاصات البكتيرية

يعتمد مبدأ هذه التقنية على استخدام كاشف برادفورد الذي يتألف بشكل رئيسي من أزرق الكوماسي Coomassie Blue G250 وهو ملون يرتبط بالبروتينات بروابط كهربائية ساكنة كارهة للماء معطياً معقداً أزرق اللون يمتص الضوء بطول الموجة 595nm، تكون شدة الامتصاص على علاقة طردية مع تركيز البروتين في العينة.

المحاليل المستخدمة:

- Bradford 1X (BioRad®).
- PBS 10X: ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 101.4 mM, NaCl 1.37 M, KH_2PO_4 17.6 mM, KCl 27 mM Adjust to pH 7.4 With HCl).
- 1µg/µl BSA stock in PBS 1X

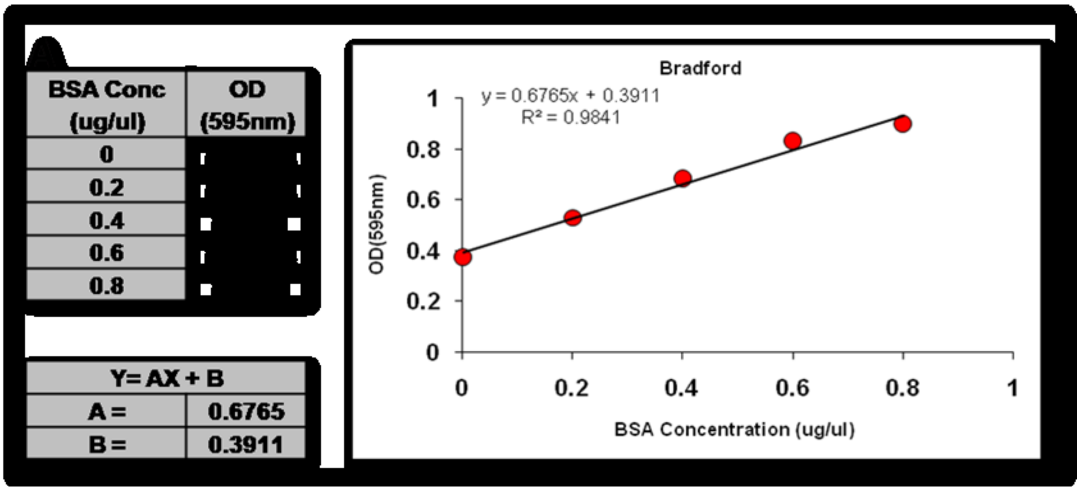
طريقة العمل:

- تحضر خمس تخفيفات من بروتين عياري ألبومين مصل البقر الـ Bovine Serum Albumin في محلول الـ PBS وهي (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 µg/µl) الجدول (6).

الجدول (6): تراكيز الـ BSA من أجل تحضير المنحني المعياري لحساب تركيز البروتين

Total volume (µl)	From PBS 1X (µl)	From BSA stock (1µg/µl) (µl)	BSA concentration (µg/µL)
200	200	0	0
200	160	40	0.2
200	120	80	0.4
200	80	120	0.6
200	40	160	**0.8**

- قياس مكررين أو ثلاثة لعينات الخلاصات البكتيرية المحضرة مع إجراء التمديد بمحلول الـPBS إذا لزم الأمر.
- إضافة 10 µl بكل بئر من آبار صفيحة 96 بئر من المحلول العياري أو من محلول العينة.
- إضافة 200 µl من كاشف Bradford 1X يتم خلط العينة والكاشف جيداً باستخدام microplate mixer.
- حضن بدرجة حرارة الغرفة أقل من خمس دقائق، حيث تزداد الامتصاصية بمرور الوقت. وقياس الامتصاصية بطول موجة 595 nm.
- حساب تركيز العينة حسب معادلة المستقيم العياري (الشكل 14).



(الشكل 14): مُنحني المعياري لقياس تركيز البروتين

حُضر باستخدام تراكيز مختلفة من الـ BSA، (A امتصاصية البروتين العياري BSA على طول موجة 595nm).

3.4.2. اختبار فعالية الأضداد المعزولة من مصل الجمل على الخلاصات البروتينية للبروسيلا بتفاعل الـ ELISA

لقد تم مسبقاً فصل المكونات الضدية المختلفة لمصل الجمل الممنع بالبروسيلا وهي الأضداد التقليدية الـ (IgG1) والأضداد ذات السلسلة الثقيلة (IgG2 and IgG3)، واختبرت فعاليتها على بروتينات البروسيلا المحضرة بطريقة الغوانيدين والبروتينات المستخلصة بالموقي الحال بدون غوانيدين وذلك بتفاعل المقايسة المناعية الإنزيمية.

المحاليل المستخدمة:

- PBS 1X.
- Blocking buffer (skimmed milk 3 % in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 1 % in PBS 1X).
- T-PBS (Tween-20 0.05% in PBS 1X).
- TMB (SIGMA®).
- 1M H2SO4.

طريقة العمل:

- تثبيت الخلاصات البروتينة للبروسيلا المحضرة بطريقة الغوانيدين وبالطريقة التقليدية ضمن صفيحة المقايسة (96 بئر) بتركيز 25 µg /well في الـ PBS 1X وبحجم نهائي 200 µl، حفظ بالدرجة 4°م مدة 16 ساعة.
- إضافة 200 µl من Blocking buffer للصفيحة، حضن مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل الصفيحة 3 مرات بالـ T-PBS.

- إضافة 100 µl من الأضداد IgG1 و IgG2 و IgG3 ومصل الجمل غير الممنع بتمديد 1/1000 في موقي تمديد الأضداد، حضن مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، غسل 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 100 µl من Rabbit anti Camel الممدد 1/3000، حضن الصفيحة مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، غسل 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 100 µl من Goat anti Rabbit الممدد 1/3000 والموسوم بالبيروكسيداز، حضن الصفيحة مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، غسل 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 50 µl من كاشف TMB وحض بالظلام مدة 15 دقيقة لظهور اللون الأزرق.
- إيقاف التفاعل بإضافة 25 µl لكل بئر من 1M H_2SO_4 لظهور اللون الأصفر.
- قياس شدة الامتصاصية على طول موجة 450 nm.

5.2. انتقاء الأضداد النانوية النوعية لبروتينات البروسيلا

تم في هذه المرحلة انتقاء الأشكال الضدية النوعية لخلاصات البروسيلا المحضرة وذلك باستخدام تقنية الفاجات العارضة (Phage Display)، حيث أن إضافة الفاج (ملتهم البكتيريا M13) إلى مستعمرات المكتبة المورثية للأضداد النانوية المحضرة مسبقاً من لمفاويات جمل مُمَنَّع بالبروسيلا الضأنية يؤدي لإنتاج فاجات يعرض كل منها على سطحه واحداً من الأضداد النانوية، بحيث نحصل على تنوعية عالية من الفاجات (المكتبة الفاجية) التي يعرض كل منها على سطحه ضداً نانوياً ويحمل في داخله مورثة هذا الضد ضمن البلاسميد (pHEN4). باستخدام بروتينات البروسيلا المحضرة، يتم غربلة المكتبة الفاجية وانتقاء فقط الفاجات العارضة للأضداد النانوية وذات الألفة العالية لهذه البروتينات.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- LB (Luria-Bertani) medium (1L): Tryptone 10 g, Yeast Extracts 5 g, NaCl 10 g.
- 100 mM $NaHCO_3$, pH 9.6.
- 100 mg/mL Ampicillin.
- 20 % Glucose.
- 70 µg/mL kanamycine.
- PEG/NaCl solution (20 % polyethylene glycol 6000, 2.5 M NaCl).
- 7% PBS in DMSO.
- Blocking buffer (Skimmed milk 3 % in PBS 1X).
- T-PBS (Tween-20 0.05 % in PBS 1X).
- 100 mM triethylamine (pH ~10) (70 µl TEA in 5ml H_2O).
- 1 M Tris-HCl (pH 7.4).

1.5.2. تثبيت المستضدات ضمن أنابيب المقايسة المناعية

طريقة العمل:

- تم تثبيت مستضدات البروسيلا بنوعيها الضأنية والمجهضة واليرسينيا ضمن أنابيب ELISA (Nuuc®) بتركيز 25 µg /well في (100 mM NaHCO3, pH 9.6) وبحجم نهائي 500 µl. وحُفِظَت في الدرجة 4°م لليوم التالي.

2.5.2. تحضير الفاجميدات (Preparation of phagemids)

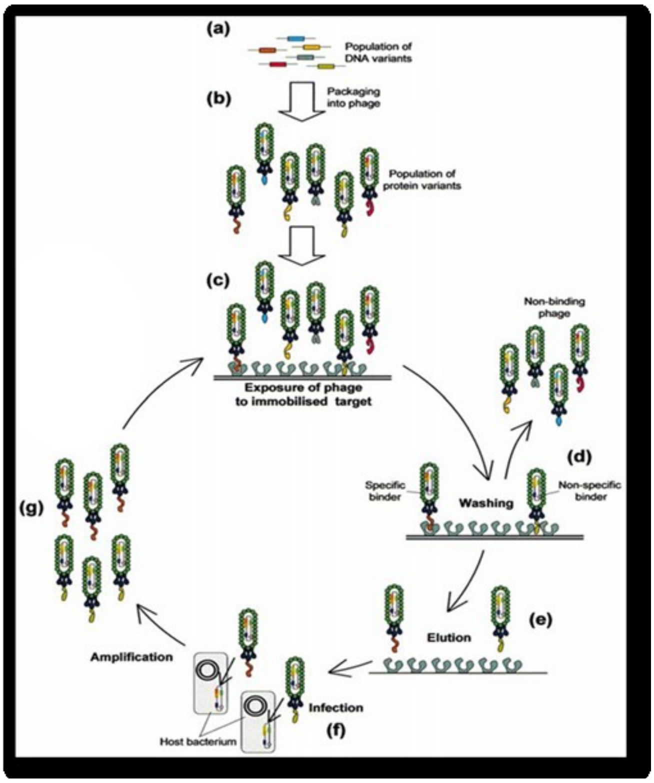
طريقة العمل:

- استنبات 250 µl من البكتيريا *E. coli* TG1 التي تحتوي على مكتبة الأضداد النانوية في 100 مل من وسط 2YT حاوي الأمبسيلين (100 µg/mL) وغلوكوز 2%.
- حضن بالدرجة 37°م مدة 2-3 ساعات مع الرج بسرعة 250-300 rpm.
- إضافة 10^{12} Helper phage M13KO7 (new England biolab®) إلى المستنبت لإحداث العدوى.
- حضن بالدرجة 37°م مدة نصف ساعة مع الرج، ثم تثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 4000 rpm.
- تعليق الراسب بـ 200 مل من وسط 2YT حاوي أمبسيلين (100 µg/mL) وكاناميسين(70 µg/mL).
- حضن بالدرجة 37°م مدة 24 ساعة مع الرج بسرعة 250-300 rpm.
- تثقيل المستعمرات البكتيرية مدة 30 دقيقة بسرعة 4000 rpm.
- نقل الطافي لعبوات تثقيل (250 مل) جديدة حاوية على 50 مل PEG/NaCl، وحضن لمدة ساعة بالثلج مع التحريك من حين لآخر، ثم التثقيل لمدة 30 دقيقة بسرعة 4000 rpm.
- التخلص من الطافي، وحل الراسب بـ1 مل PBS+ DMSO 7 %، ثم نقل المزيج لأنابيب 1.5 مل، من ثم التثقيل لمدة 5 دقائق بأقصى سرعة للتخلص من بقايا البكتيريا.
- تمديد مزيج المكتبة الفاجية (1/50) وقياس تركيز الفاجات فيها على طول موجة 260 nm، حيث تعادل الـ (1) OD 260 بحدود 10^{11} فاج.

3.5.2. غربلة مكتبة الأضداد النانوية الموراثية (Panning)

طريقة العمل:

- حضن مستعمرة واحدة من *E.Coli* TG1 في 10 مل من وسط LB بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 250-300 rpm.
- حضن ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل أنابيب المقايسة التي تحتوي المستضدات المثبتة 5 مرات بالـ PBS 1X.
- إضافة 10^{11} من فاجات المكتبة إلى كل أنبوب، ثم الحضن لمدة ساعة وبدرجة حرارة الغرفة.
- غسل 20 مرة بالـ T-PBS.
- فصل ارتباط الأضداد النانوية النوعية المعروضة على سطح الفاجات عن المستضدات (eluted phages) بإضافة 500 µl من مادة Triethylamine، ثم حضن الصفيحة مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة مع الرج.
- نقل الـ eluted phages إلى أنابيب جديدة وإضافة 300 µl من محلول 1M Tris لتعديل الوسط،.ومن ثم استخدامه في إصابة خلايا بكتيرية جديدة (TG1) لتكون قاعدة انطلاق لدورة جديدة من عملية الغربلة بذات المستضد أو باستخدام مستضدات جديدة (الشكل 15).
- تخفيف الـ eluted phages بنسبة 1/10 باستخدام PBS 1X.
- إضافة 10 µL من الفاجات المخففة و90 µL من خلايا TG1 إلى صفيحة 96 بئر للحصول على التخفيفات 10^3 و10^4 و10^5 و10^6.
- حضن الصفيحة لمدة 30 دقيقة وبالدرجة 37°م بدون رج.
- استنبات تخفيفات البكتيريا على وسط LB أغار حاوي امبسيلين (100 µg/ml) وغلوكوز2%، حضن لمدة 16 ساعة بالدرجة 37°م.



(الشكل 15): غربلة المكتبة الموروثية للأضداد النانوية بطريقة الفاج العارض

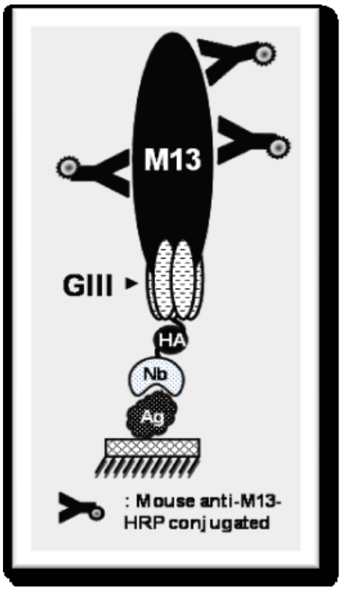
يوضح الشكل تنسيل تسلسلات DNA المرمزة للأضداد النانوية (a) ضمن جينوم الفاج للحصول على مكتبة فاجية يعرض كل منها على سطحه ضداً نانوياً (b) وانتقاء فقط الفاجات العارضة للأضداد النانوية ذات الألفة العالية لبروتينات البروسيلا (c) والتخلص من الارتباطات غير النوعية بعملية الغسيل (d) ومن ثم فك ارتباط الفاجات العارضة للأضداد عن المستضدات (e)، ومن ثم استخدامها في إصابة خلايا بكتيرية جديدة (f) لتكون قاعدة انطلاق لدورة جديدة من عملية الغربلة (g).

4.5.2. اختبار مورثات الأضداد النانوية بوساطة الـ PCR

تم التأكد من صحة أطوال مورثات الأضداد النانوية المنتقاة بإجراء تفاعل الـ PCR، باستخدام المرئستين (المرئسة الموجهة RP والعكسية GIII). ثم جرى تقطيع مورثات الأضداد النانوية المضخمة بتفاعل الـ PCR السابق باستخدام أنزيم التقييد HinfI (Fermentaze®) وترحيل ناتج القطع على هلامة الأغاروز 2%.

5.5.2. اختبار الفاجات العارضة للأضداد النانوية بتفاعل المقايسة المناعية الإنزيمية

في هذه الخطوة تم اختبار نوعية الأضداد النانوية التي تحويها المستعمرات البكتيرية الناتجة من عملية الغربلة نحو مستضدات البروسيلا عن طريق المقايسة المناعية الأنزيمية. يعتمد مبدأ هذه التقنية على إنتاج الأضداد النانوية على شكل بروتينات معروضة على سطح الفاجات. ومن ثم التحقق من حدوث الارتباط بين الضد النانوي المعروض والمستضد المثبت باستخدام الضد النوعي للفاج (Anti-M13 HRP) الموسوم بالبيروكسيداز (الشكل 16).



(الشكل 16): شكل تمثيلي يوضح بنية الفاج العارض للضد النانوي

يوضح الشكل بنية الفاج العارض للضد النانوي الذي ينتج عن إصابة المستعمرة البكتيرية الحاوية على مورثة هذا الضد بالفاج المساعد، حيث يكون الضد النانوي مرتبط بالبروتين (GIII) الذي يعتبر واحد من المكونات الأساسية لغلاف الفاج. يمكن الكشف عن هذه البنية المعقدة بعد ارتباطها بالمستضدات المثبتة، من خلال الضد النانوي، وذلك باستخدام ضد الفاج الموسوم بالبيروكسيداز (Anti-M13 HRP).

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- 100 mM $NaHCO_3$, pH 9.6.
- 100 µg/mL Ampicillin.
- 20% Glucose.
- Blocking buffer (skimmed milk 3% in PBS 1X).
- T-PBS (Tween-20 0.05% in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 1% in PBS 1X).
- TMB.
- 1M H2SO4.

<u>طريقة العمل:</u>

- <u>اليوم الاول:</u>
- تثبيت مستضدات البروسيلا الضأنية والمجهضة واليرسينيا وبروتينات الغشاء الخارجي للبروسيلا الضأنية وبكتيريا البروسيلا الضأنية ككل بدون تحطيم ضمن صفيحة المقايسة (96 بئر) بتركيز 25 µg /well في (100 mM NaHCO3, pH 9.6) وبحجم نهائي 100 µl، وحفظ في الدرجة 4°م.
- استنبات المستعمرات البكتيرية الناتجة من عملية الغربلة ضمن 1 مل من وسط 2YT الحاوي أمبسيلين وغلوكوز % 2 ضمن صفيحة 24 بئر.
- حضن الصفيحة لمدة 2–3 ساعات وفي الدرجة 37°م مع الدوران بسرعة 250-300 rpm.

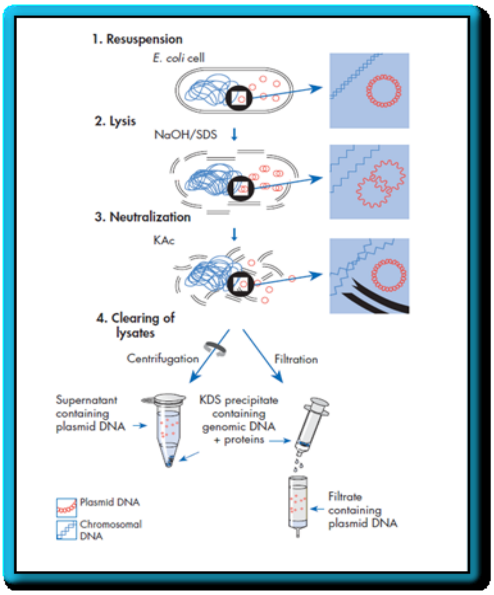
- إضافة 10 µL لكل بئر من M13KO7 Helper phage ذو التركيز 10^{10} فاج/مل.
- حضن بالدرجة 37°م مدة نصف ساعة مع الرج.
- تثفيل الصفيحة مدة 15 دقيقة بسرعة 4000 rpm.
- تعليق الراسب ضمن آبار الصفيحة بـ1 مل من وسط 2YT حاوي أمبسيلين وكاناميسين.
- حضن الصفيحة بالدرجة 37°م مدة 16 ساعة مع الدوران بسرعة 250-300 rpm.
- اليوم الثاني:
- إضافة 200 µl من Blocking buffer لصفيحة المقايسة الحاوية على المستضدات المثبتة، حضن مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل الصفيحة 3 مرات بالـ PBS 1X.
- إضافة 200 µl من Blocking buffer ضمن صفيحة 24 بئر، الحاوية على المستعمرات البكتيرية والفاجات، تثفيل الصفيحة مدة 10 دقيقة بسرعة 400 rpm.
- إضافة 100 µl من طافي المستعمرات لصفيحة المقايسة وحضنها مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل الصفيحة 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 100 µl من Anti-M13 HRP الموسوم بالبيروكسيداز الممدد 1/2000 ضمن موقي التمديد، حضن صفيحة المقايسة مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل صفيحة المقايسة 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 50 µl لكل بئر من كاشف TMB وحضن الصفيحة بالظلام مدة 15 دقيقة لظهور اللون الأزرق.
- إيقاف التفاعل بإضافة 25 µl لكل بئر من 1M H_2SO_4 لظهور اللون الأصفر.
- قياس شدة الامتصاصية على طول موجة 450 nm.

6.2.إعادة تنسيل الأضداد النانوية في بلازميد التعبير المورثي (pHEN6)

في هذه المرحلة تم عزل مورثات الأضداد النانوية من الفاجميد (pHEN4) وذلك من أجل تنسيلها من جديد في بلازميد (pHEN6)، وهذا البلازميد يسمح بالتعبير عن البروتينات بكميات كبيرة في البكتيريا *E.Coli* WK6، ويكون البروتين المعبر عنه حاوي في الطرف الأميني على ذيل من ست أحماض هيسيتيدين أمينية (6x HIS).

1.6.2. عزل الـ DNA البلازميدي

تستخدم هذه الطريقة لعزل الفاجميد (pHEN4) الحاوي مورثات الأضداد النانوية المنتقاة من معلق الخلايا البكتيرية (الشكل 17)، وذلك باستخدام طاقم Bio Rad Aruum Plasmid Mini Kit Protocol.



(الشكل 17): تقنية عزل البلازميد من البكتيريا.

مخطط توضيحي يظهر عملية عزل البلازميد من البكتيريا وذلك بتحليل البكتيريا بالموقي الحال، ومن ثم إجراء الفلترة للحصول على البلازميد نقي.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- LB (Luria-Bertani) medium.
- 100 µg/mL Ampicillin.
- Resuspension solution: (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg RNAase).
- Lysis solution: (200 mM NaOH, 1 %SDS).
- Neutralization solution: (2.55 mM KAC pH 4.8).

<u>طريقة العمل:</u>

- استنبات 1-5 مل من البكتيريا في وسط LB مع امبسيلين وحضن بالدرجة 37° م مع الدوران لليوم الثاني.
- ترسيب البكتيريا بتثقيلها بالسرعة القصوى مدة 5 دقائق والتخلص من الطافي.
- إضافة 250 µl محلول resuspension والمزج جيداً.
- إضافة 250 µl محلول lysis والمزج الهادىء للأنبوب ست مرات، ثم حضن مدة 3 دقائق بدرجة حرارة الغرفة حتى تمام انحلال البكتيريا.
- إضافة 350 µl محلول neutralization وإجراء مزج هادئ للأنبوب ست مرات، ثم حضن مدة 5 دقائق بالثلج.
- تثقيل بالسرعة القصوى مدة 5 دقائق للتخلص من الحطام البكتيري.
- نقل الطافي الى أعمدة الترشيح mini spin/vac column، وتثقيل 1 دقيقة والتخلص من الرشاحة.
- إضافة 750 µl من محلول الغسيل والتثقيل مدة دقيقة ومن ثم رمي الرشاحة.
- إعادة التثقيل مدة دقيقة للتخلص من آثار محلول الغسل.
- نقل أعمدة الترشيح لأنابيب جديدة ونظيفة، ثم إضافة 50 µl محلول elution، انتظار مدة دقيقة ثم تثقيل الأنابيب مدة دقيقة.
- تحفظ الرشاحة الحاوية على البلازميدات ويقاس تركيز الـ DNA فيها.

2.6.2. تقطيع المورثة والبلازميد باستخدام أنزيمات التقييد (Digestion Reaction)

انطلاقاً من البنى الفاجميدية الناتجة عن مرحلة الغربلة يتم تضخيم شدف الـ DNA الحاوية على مورثات الأضداد النانوية باستخدام المرئيستين (المرئسة الموجهة RP والعكسية GIII). بعد ذلك يتم مُعاملة كلاً من ناتج تضخيم مورثات الأضداد النانوية والبلازميد pHEN6 بأنزيمي التقييد الـBstEII والـPstI (Fermentaze®) تمهيداً لإجراء التنسيل.

طريقة العمل:

- إضافة المكونات التالية بعد اختيار البفر اللازم لعمل الأنزيمين وذلك من أجل قطع 1 µg من الـDNA حسب الجدول (7):

الجدول (7): مكونات تفاعل القطع.

10x stock	1µl	**Enzyme buffer**
10 u/µl	1 µl	**Enzyme PstI**
10 u/µl	1 µl	**Enzyme BstEII**
	1 µg	**DNA (plasmid/Pcr product)**
	To 10 µl final volumE	**H_2O**

- حضن التفاعل بالدرجة 37 ْم مدة 3 ساعات.
- تثبيط نشاط الأنزيمات بوضع الأنبوب بحمام مائي 65 ْم مدة 10 دقائق.
- ترحيل ناتج قطع الأضداد النانوية على هلامة الأغاروز % 1.5.

3.6.2. تنقية مورثات الأضداد النانوية من هلامة الأغاروز

بعد ترحيل ناتج القطع يتم تنقية الشدف من الهلامة باستخدام طاقم Promega Wizadr ® SV Gel and PCR clean-up system.

المحاليل المستخدمة:

- Binding buffer: (4.5 M guandine isothiocyanate, 0.5 M potassium acetate pH=5)
- Wash buffer: (10 mM potassium acetate, 16.7 mM EDTA, 80% EtoH).

طريقة العمل:

- قص عصابات الـ DNA للأضداد النانوية (400 pb) من هلامة الأغاروز بعد الرحلان الكهربائي ووضعها في أنبوب إيبندورف (1.5 مل).
- حساب وزن قطعة الهُلامة الحاوية على الشدفة من خلال حساب وزن الأنبوب قبل وبعد إضافة الهلامة.
- إضافة 3 µl من محلول الـ Binding Buffer لكل 1 µg من قطعة الهلامة.
- وضع الأنابيب في حمام مائي بالدرجة 65 ْم حتى ذوبان قطعة الهلامة جيداً.

- نقل العينات لأعمدة الترشيح ثم الحضن مدة دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
- تثقيل بسرعة 14500 rpm مدة دقيقة ثم التخلص من الراشح.
- إضافة 700µl من محلول الغسيل.
- تثقيل بسرعة 14500 rpm مدة دقيقة ثم التخلص من الراشح.
- إضافة 500 µl من محلول الغسيل ثم تثقيل مدة 5 دقائق وبعدها التخلص من الراشح.
- تثقيل بسرعة 14500 rpm مدة دقيقة ثم التخلص من الراشح.
- نقل أعمدة الترشيح لأنابيب جديدة ونظيفة.
- إضافة 30 µl ماء مقطر، انتظار مدة دقيقة ثم تثقيل مدة دقيقة.
- قياس تركيز الـ DNA وحفظه في الدرجة 4°م.

4.6.2. تفاعل ربط المورثة إلى البلازميد (Ligation Reaction)

يتم ربط مورثة الضد النانوي إلى البلازميد (pHEN6) بوساطة أنزيم الربط T4 DNA ligase الذي يقوم بلحم النهايات المتطابقة لكل من المورثة والبلازميد بعد أن تم تقطيعهما بنفس أنزيمات التقييد لكل نهاية.

المحاليل المستخدمة:

- T4 DNA ligase (5 U/µl)
- Ligase buffer (10 X): (400 mM Tris - HCl pH 7.8, 100 mM MgCl2)

طريقة العمل:

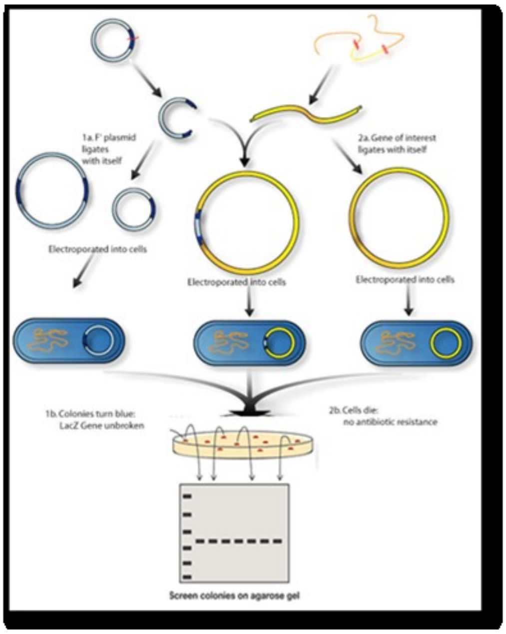
- حساب الكمية المطلوبة (ng) من شدفة المورثة المقطوعة (insert) للحمها بالبلازميد المقطوع (vector) المستخدم بكمية (50 ng) في التفاعل بحيث يتحقق التناسب بينهما (ratio) بمقدار (1:3)، ويتم ذلك وفق المعادلة:

$$\text{Insert of ng} = \frac{\text{50ng of vector} \times \text{Kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{molar ratio of } \frac{\text{insert}}{\text{vector}}$$

- إضافة 5 U/µl من أنزيم الربط إلى المزيج.
- إضافة 1 µl من محلول Ligase buffer 10 X.
- إكمال حجم المزيج إلى 10 µl من الماء المقطر.
- حضن المزيج في حمام مائي درجة حرارة 16 °م ولمدة ست عشرة ساعة.
- تثبيط أنزيم الربط من خلال حضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 65°م مدة 10 دقائق.

5.6.2. التحوير البكتيري (Transformation)

تم إدخال ناتج ربط المورثة – البلازميد إلى خلايا الـ *E.coli*, wk6 المهيئة لاستقبال البلازميد (الشكل18).



(الشكل 18): عملية تنسيل المورثة داخل البكتيريا.

مخطط توضيحي يبين عمليات تنسيل المورثة داخل البكتيريا، حيث يتم قطع البلاسميد والمورثة بأنزيمات التقييد ومن ثم إجراء عملية ربط للمورثة والبلازميد. بعد ذلك يتم إدخال نواتج تفاعل ربط مورثة–بلازميد للبكتيريا وزراعة المستعمرات البكتيرية على أوساط انتقائية حيث تتمكن البكتيريا التي تلقت البنية البلازميدية الصحيحة الربط من النمو. يتم انتقاء المستعمرات النامية بتفاعل الـ PCR.

6.6.2. تهيئة الخلايا البكتيرية (Electrocompetent cells)

قبل عملية الإدخال لابد من تهيئة البكتيريا لاستقبال البلازميد من خلال رفع حيويتها وتخليصها من الأملاح التي قد تؤثر على العملية.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- 1 mM Hepes pH 7: (58 mg in L H_2O).
- 10% glycerol (2 litre per litre culture) (Duchefa Biochemie).

<u>طريقة العمل:</u>

- استنبات مستعمرة من *E.coli*,wk6 في 10 مل LB وحضن مدة 16 ساعة مع بالدرجة 37°م من الدوران.
- إضافة 1 مل من المستعمرة في 250 مل 2YT وحضن بالدرجة 37°م مدة 2 ساعة مع الدوران لتصل الكثافة الضوئية OD600 = 0.5 – 0.6.

- حضن المستنبتات مدة ساعة بالثلج مع التحريك كل فترة.
- نقل المستنبات إلى عبوات 250 مل ثم التثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 4000 x g / 4°C (Break 6) ثم التخلص من الطافي.
- إضافة 250 مل Hepes وإعادة تعليق البكتيريا عن طريق تدويرها بهدوء.
- تثقيل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 x g / 4°C (Break 6) والتخلص من الطافي.
- إضافة 250 مل 10 % glycerol وإعادة تعليق البكتيريا عن طريق تدويرها بهدوء.
- تثقيل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 x g / 4°C (Break 6) والتخلص من الطافي.
- إضافة 125 مل 10 % glycerol وإعادة تعليق البكتيريا عن طريق تدويرها بهدوء.
- تثقيل مدة 10 دقائق بسرعة 4000 x g / 4°C (Break 6) والتخلص من الطافي.
- إعادة تعليق الراسب بـ1 مل 10 % glycerol وينقل الطافي لأنابيب 1.5 مل.
- قياس تركيز الخلايا بعد تمديدها (1/50) على طول موجة 600 nm، حيث تعادل الـ (1) OD 600 بحدود 2.5×10^8.
- توزع الخلايا على أنابيب بحجم 250µ l وتحفظ بالـ -80° م.

7.6.2. التخريم الكهربائي للبكتيريا المهيئة (Electroporation of Competent cells)

المحاليل المستخدمة:

- LB Agar with Ampicilin
- SOB: (2 % Tryptone, 0.5 % Yeast extract, 10 mM NaCl, 2 mM KCl).
- Mg^{++}: (1 M $MgCl_2.6H_2O$, 1 M $MgSO_4.7H_2O$).
- SOC: (20 mM Glucose, 20 mM Mg^{++}, 2 MSOB).

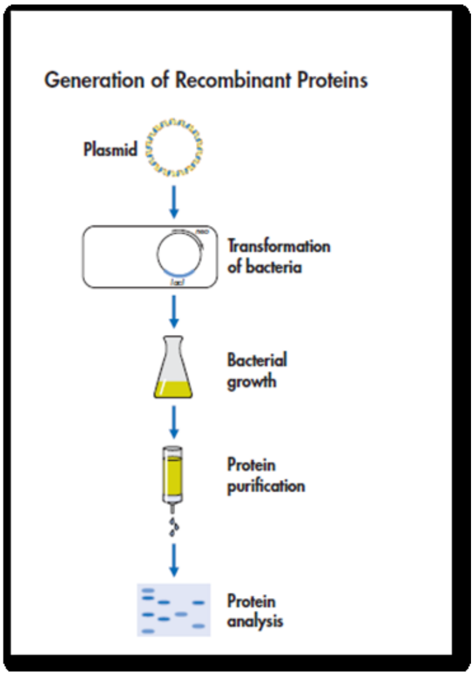
طريقة العمل:

- جمع ناتج تفاعل الربط (على الأقل 5 µl) والخلايا البكتيرية المهيئة (40 µl) ضمن أنابيب ايبندروف باردة.
- نقل المزيج إلى كوفيتات الصعق 1 mm (Biorad®) electroporation cuvette، الحضن بالثلج مدة دقيقة واحدة.
- تجفيف الكوفيت جيداً ثم وضعها ضمن جهاز الصعق وتشغيل الجهاز بشدة 1.8 kV/cm.
- إضافة 1 مل من محلول الـ SOC والمزج جيداً ثم نقل الوسط إلى أنابيب ايبندروف.

- حضن الأنابيب مدة ساعة بالدرجة 37 ْم مع الدوران.
- استنبات 200 µl من البكتيريا المحورة على أطباق LB مع امبسيلن وحضنها بالدرجة 37 ْم مدة 16 ساعة.
- انتقاء عدد من المستعمرات البكتيرية من الطبق واختبارها بتفاعل الـ PCR باستخدام المرئستين (الموجهة RP والعكسية FP).

7.2. تقنيات البروتين (Protein techniques)

بعد عملية التحوير البكتيري بالبنى البلازميدية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية يتم التعبير عن البروتينات وتنقيتها مخبرياً باستخدام تقنية الفصل بالأعمدة المشبعة بشوارد النيكل المعروفة بإلفتها العالية لأحماض الهيسيتيدين الأمينية، ومن ثم التأكد من عملية التعبير والتنقية بترحيلها عبر هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) (الشكل 19).



(الشكل 19): إنتاج وتنقية البروتينات المؤشبة

يوضح الشكل مراحل التعبير البروتيني. فبعد إدخال بلازميد التعبير البروتيني الحاوي على المورثة المطلوبة إلى البكتيريا، يتم تنميتها ثم تحريض التعبير البروتيني ومن ثم تنقية البروتين المعبر عنه على أعمدة الفصل المشبعة بشوارد النيكل. بعد التنقية يتم ترحل العينات قبل وبعد التنقية عبر هلامة الأكريلاميد.

1.7.2. التعبير البروتيني (Protein expression)

يتيح البلازميد pHEN6 التعبير عن الأضداد النانوية، بحيث تحوي على التسلسل الاشاري (PelB) وذيل متعدد الهستيدين في الطرف الكربوكسيلي. يُمكن التسلسل الاشاري من الانتقال إلى الوسط المحيط للبكتيريا مما يسمح بتنقيته باستخدام طريقة الصدمة الحلولية ضمن موقي مشبع بالسكاروز (TES).

المحاليل المستخدمة:

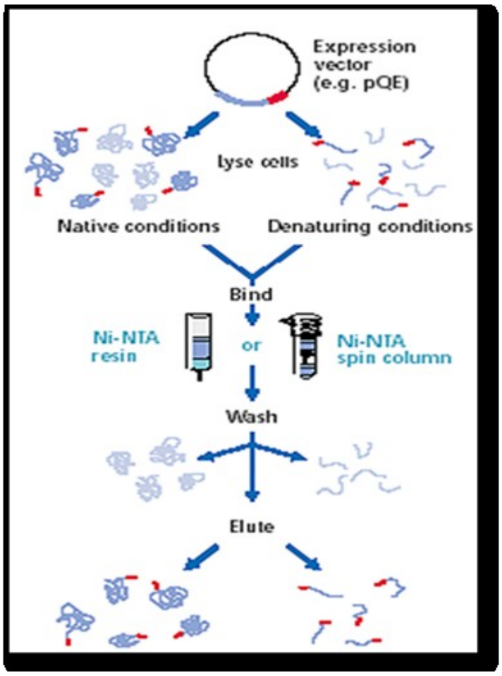
- TB per liter: (2.3 g KH2PO4, 16.4 g K2HPO4.3H2O, 12 g Tryptone, 24 g Yeast, 4 ml 100% glycerol)
- 100 mg/ml Ampicillin.
- 1 M $MgCl_2$.
- 20 % glucose.
- 1 M IPTG (Duchefa Biochemie®).
- TES: (0.2 M Tris pH8.0, 0.5 mM EDTA, 0.5 M sucrose).
- TES/4: TES diluted 4 times in water.

طريقة العمل:

- اليوم الأول:
- استنبات مستعمرة بكتيرية في 10 مل LB حاوي امبسيلين وحضن بالدرجة 37°م مدة 16 ساعة مع الدوران.
- اليوم الثاني:
- استنبات 1 مل من المستعمرة السابقة في 250 مل TB حاوي أمبسيلين وغلوكوز % 0.1 و 2 mM MgCl2.
- حضن بالدرجة 37°م مع الدوران 200 rpm لتصبح OD600 = 0.6-0.9.
- إضافة 1 mM IPTG ويتم الحضن بالدرجة 28°م مدة 16 ساعة.
- اليوم الثالث:
- تثفيل البكتيريا مدة 5 دقائق بسرعة 8000 rpm ويتم التخلص من الطافي.
- يعاد تعليق الراسب بـ3 مل TES ويتم الحضن بالثلج مدة ساعة مع الرج.
- إضافة 6 مل TES/4 ويتم الحضن بالثلج مدة ساعة مع الرج.
- تثفيل مدة 30 دقيقة بسرعة 8000 rpm وبالدرجة 4°م والتخلص من الراسب.
- يحوي الطافي الناتج على بروتينات السيتوبلاسما المحيطية ومن بينها الضد النانوي المعبر عنه.

2.7.2. تنقية البروتين المأشوب بوساطة كروماتوغرافيا الألفة: Protein purification by affinity chromatography

تمرر الخلاصة البكتيرية الحاوية على بروتينات الأضداد النانوية ممزوجة بالمحتوى البروتيني للبكتيريا على عمود الفصل المشبع بشوارد النيكل وذلك باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة، فترتبط الأضداد النانوية بشوارد النيكل نظراً لاحتوائها على ذيل عديد الهسيتدين ذو الألفة العالية لشوارد النيكل في حين أن البروتينات المتبقية في الخلاصة تغادر العمود مع سائل الغسل (الشكل 20). يتم فصل بروتين الضد النانوي من العمود باستخدام محلول موقي يحتوي على إيميدازول ذو إلفة لشوارد النيكل ومنافس لزمرة الهيستيدين السداسية. ثم تتم ديلزة البروتينات المنقاة بوساطة أنابيب Concentretar (Viva sceience ®) للتخلص من آثار الايميدازول، تتميز هذه الأنابيب باحتوائها على أغشية تحتوي فتحات ذات أقطار معينة تتناسب مع حجم البروتين المراد ديلزته بحيث تحجز البروتين ضمن الغشاء وتمر الأملاح وغيرها من المواد الموجودة في العينة.



(الشكل 20): تنقية البروتين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الألفة

بعد عملية التعبير البروتيني والاستخلاص تمرر الخلاصات على أعمدة الفصل المشبعة بشوارد النيكل فترتبط البروتينات الحاوية على ذيل عديد الهستيدين ذو الألفة العالية لشوارد النيكل، بينما يتم التخلص مما تبقى بفك ارتباط البروتين بالنيكل بإدخال زمرة تنافس الهيستيدين على الارتباط بالنيكل كمركب الايميدازول حيث نحصل على البروتين النقي.

المحاليل المستخدمة:

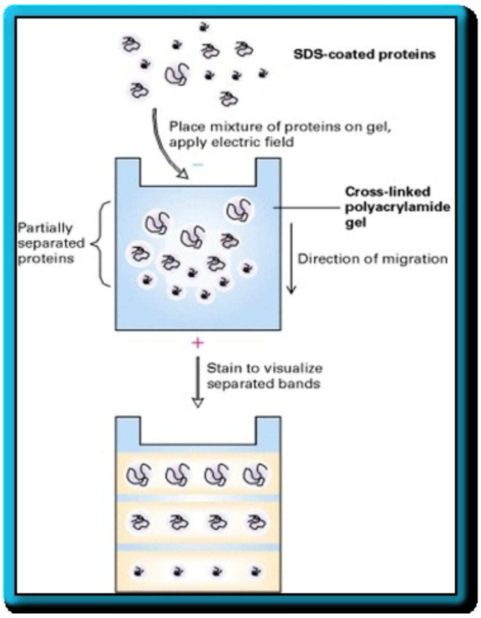
- 8 X Phosphate buffer (pH 7.4): (80 mM Na2 HPO_4. $7H_2O$, 4M NaCl, 80 mM $Na_2HPO_4.H_2O$)
- 2M Imidazole (pH 7.4).
- Binding Buffer: (Phosphate buffer 1 X, 20 mM Imidazole).
- Elution Buffer: (Phosphate buffer 1 X, 250 mM Imidazole).
- BPS 1X

طريقة العمل:

- تهيئة عمود التنقية بتمرير 10 ml من محلول Binding Buffer.
- تحضير عينة البروتين المراد تنقيتها، حيث يتم إضافة محلول 8× Phosphate buffer بتركيز نهائي 1x، ومحلول 2 M Imidazole بتركيز نهائي 20 mM لعينة البروتين المُستخلصة.
- تمرير عينة البروتين على عمود التنقية بمُعدل تدفق 2 ml / min.
- إعادة غسل عمود التنقية بـ 10 ml من محلول الـ Binding Buffer.
- فك ارتباط البروتين المأشوب بعمود التنقية من خلال تمرير 10 ml من محلول الـ Elution Buffer.
- إضافة البروتينات المنقاة لأنابيب الديلزة بقطر الثقوب أصغر من 5000 Da، وتثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 12000 xg، والتخلص من الراشح.
- إضافة 15 مل من PBS 1X إلى الأنبوب من جديد بهدف غسل البروتينات، وتثقيل مدة 15 دقيقة بسرعة 12000 xg.
- إضافة 300 µl من PBS 1X للأنبوب والمزج عدة مرات حتى يتم خلط PBS مع البروتينات المحجوزة على الغشاء.
- سحب البروتينات من أنابيب الديلزة إلى أنبوب ايبندورف (1.5 مل)، وقياس تركيزه على جهاز الـ Nanodrop ومن ثم حفظه بالدرجة 4°م.
- التأكد من البروتين المُنقى من خلال ترحيله على هلامة الأكريلاميد.

3.7.2. الرحلان الكهربائي للبروتينات (SDS-PAGE)

تعتمد هذه التقنية مبدأ فصل البروتينات تبعاً لحجمها ويعمل الـ SDS على تغيير البنية الثانوية للبروتين وتفكيكه إلى ببتيدات من خلال تفكيك الجسور الكبريتية وإعطاء البروتينات شحنة سالبة. ويتم الترحيل عبر هلامة الاكريلاميد بتطبيق حقل كهربائي حيث تترحل البروتينات من القطب السالب إلى القطب الموجب حسب وزنها الجزيئي ونتيجة للشحنة السالبة التي اكتسبها (الشكل 21).



(الشكل 21): ترحيل البروتينات على هلامة الأكريلاميد

مخطط توضيحي يظهر عملية رحلان البروتينات عبر هلامة الاكريلاميد حيث توضع عينات البروتينات ضمن آبار في أعلى الهلامة ويتم تطبيق الحقل الكهربائي فتهاجر من القطب السالب إلى الموجب نتيجة الشحنة السالبة التي منحها اياها الـ SDS، تتوزع البروتينات على طول الهلامة تبعاً لأوزانها الجزيئية، فالبروتينات الأكبر حجماً تتوضع في أعلى الهلامة والأصغر تهاجر لمسافات ابعد، يتم اظهار البروتينات باستخدام صباغ الكشف.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- 30 % Bis-Acrylamidide (Biorad®).
- 1 X TEMED.
- 0.5 M Tris-base Buffer (pH 6.8).
- 1.5 M Tris-base buffer (pH 8.8).
- 10 % SDS.
- 10 % APS.
- D1 Buffer 10 X: For 1L (Tris Base 30.3 g, Glycine 144 g)
- Electrophoresis Buffer 10 X: (100 ml D1 Buffer 10 X, SDS 10 % ddH2O).
- Staining solution 1 X: For 200 ml (500 mg Coomassie brilliant blue R–250, acetic acid 20 ml, methanol 90 ml, ddH2O 90 ml).
- Destaining solution 1 X: For 1L (methanol 450 ml, acetic acid 100 ml, ddH2O 450 ml).

طريقة العمل:

- تحضير 15 مل من هلامة الفصل Running gel 12 % وفق الجدول (8):

الجدول (8): المكونات الداخلة في تركيب هلامة الفصل

الكمية	المواد
6 ml	30% Bis-Acrylamidide
3.75 ml	1.5 M Tris-base buffer (pH 8.8)
5 ml	ddH_2O
150 µl	10 % SDS
150 µl	10 % APS
15 µl	TEMED 1 X.

- عندما تصبح هلامة الفصل جاهزة للصب، يتم إضافة 15 µl من محلول TEMED وتسكب في قالب جهاز الرحلان وتترك الهلامة تتبلمر لمدة عشر دقائق.
- إضافة طبقة من الإيزوبروبانول Isopropanol، حيث تساعد طبقة الإيزوبروبانول في منع الـ PCR وتشكُّل سطح أملس على الهلامة المتبلمرة.
- عندما تتبلمر هلامة الفصل يتم التخلص من طبقة الإيزوبروبانول وإجراء غسل بالماء المقطر.
- تحضير 3 مل من هلامة التكديس Stacking Gel 3 % وفق الجدول (9):

الجدول (9): المكونات الداخلة في تركيب هلامة التكديس

الكمية	المواد
0.396 ml	30% Bis-Acrylamidide
0.756 ml	1.5 M Tris-base buffer (pH 6.8)
1.8 ml	ddH_2O
30 µl	10 % SDS
30 µl	10 % APS
3 µl	TEMED 1 X.

- سكب هلامة التكديس فوق هلامة الفصل ضمن قالب الجهاز.
- إدخال مشط ذو سماكة 1 mm بعشرة آبار، ترك الهلامة تتبلمر لمدة خمس عشرة دقيقة، بعدها يتم إزالة المشط وغسل الآبار بالماء المقطر.
- نقل الهلامة إلى حوض الترحيل ثم إضافة محلول الرحلان الكهربائي (Electrophoresis Buffer).
- إضافة 20 µl من العينات إلى كل بئر، وإضافة 10 µl من واسم بروتين عياري معروف الوزن الجزيئي بحيث تستخدم للمقارنة مع البروتينات في العينات المرحَّلة.

- ترحيل الهلامة من خلال استخدام الفولطية 85 V حتى دخول العينات في هلامة الفصل حيث يتم رفع الفولطية إلى 110 V حتى تصل العينات إلى نهاية الهلامة.
- إضافة محلول الصبغ للهلامة مع التحريك لمدة ساعة.
- نقل الهلامة من محلول الصبغ ووضعها ضمن محلول مزيل الصبغة حتى ظهور عصائب البروتينات.

8.2. وسم الأضداد النانوية

يتم بالطريقة التقليدية كشف الأضداد النانوية وذلك باستخدام الضد anti-His الموسوم بالبيروكسيداز والذي يتعرف على الضد النانوي من خلال ذيل عديد الهستيدين. للاستعاضة عن هذه الطريقة تم وسم الأضداد النانوية المنقاة بمادة البيوتين والفلوروسين FITC (Fluoresceinisothiocyanate). إن عملية ربط الأضداد النانوية بهاتين المادتين متشابه جداً وعادة ما يتم ربط الأضداد بهما بنفس الوقت.

المحاليل المستخدمة:

- DMSO.
- NHS-Biotin (N-Hydroxy succinimidobiotin) (Sigma®).
- NHS-Fluroescein (N-Hydroxy succinimidefluroescein) (Sigma®).
- PBS 1X

- **طريقة العمل:**

- حل 1 ملغ من المادة الواسمة (البيوتين والفلوروسين) في 1 مل DMSO.
- إضافة 10 µl من المادة الواسمة لـ2 ملغ من الأضداد النقية.
- حضن مع الرج مدة 2–4 ساعات بالدرجة 25 ْم.
- ديلزة الأضداد الموسومة بالـ PBS 1X ضمن أنابيب الديلزة (5000 Da) بالتثفيل مدة 15 دقيقة بسرعة12000 xg.
- إضافة 100 µl PBS 1x والمزج عدة مرات حتى يتم خلط PBS مع الأضداد المحجوزة على الغشاء.
- نقل الأضداد الموسومة إلى أنابيب ابيندورف.
- إضافة 50 % غليسيرول والحفظ بالدرجة –20 ْم.

1.8.2. اختبار الأضداد النانوية النقية والأضداد الموسومة بالبيوتين بتفاعل المقايسة المناعية

المحاليل المستخدمة:

- PBS 1X.
- Blocking buffer (skimmed milk 3 % in PBS 1X).
- Antibody dilution buffer (Skimmed milk 1 % in PBS 1X).
- T-PBS (Tween-20 0.05 % in PBS 1X).
- TMB.
- 1M H_2SO_4.

طريقة العمل:

- تثبيت مستضدات البروسيلا واليرسينيا ضمن صفيحة المقايسة (96 بئر) بتركيز 25 µg /well في الـ PBS 1X، حفظ بالدرجة 4°م مدة 16 ساعة.
- إضافة 200 µl من Blocking buffer للصفيحة، حضن مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل الصفيحة 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 100 µl من الأضداد النانوية النقية والأضداد الموسومة بالبيوتين الممددة 1/500، حضن مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة.
- غسل الصفيحة 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 100 µl من Anti-HIS HRP المرتبط بالبيروكسيداز الممدد 1/1000 للأضداد النقية وإضافة 100µl من Streptavidin- HRP المدد 1/1000 للأضداد الموسومة.
- حضن الصفيحة مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، غسل 3 مرات بالـ T-PBS.
- إضافة 50 µl من كاشف TMB وحضن بالظلام مدة 15 دقيقة لظهور اللون الأزرق.
- إيقاف التفاعل بإضافة 50 µl لكل بئر من 1M H_2SO_4 لظهور اللون الأصفر.
- قياس شدة الامتصاصية على طول موجة 450 nm.

2.8.2. اختبار الأضداد النانوية الموسومة بالفلوروسين ضمن البالعات

تم اختبار نوعية الأضداد النانوية الموسومة بالفلوروسين تجاه مستضدات البروسيلا ضمن البالعات المعزولة من دم أغنام غير مصابة بالبروسيلا. فقد تم استنبات الخلايا ضمن صفائح خاصة بزراعة الخلايا، تصاب هذه الخلايا بالبروسيلا من ثم يتم كشفها بالأضداد النانوية الموسومة بالفلوروسين.

<u>المحاليل المستخدمة:</u>

- RPMI 1640 medium with L-glutamine (Euro-lone®).
- Formaldehyde
- 1 % Tritone
- PBS 1 X.
- 2YT.
- 2 % H_2O_2.
- Rupture solution :Stock A(1L): (1.8 mM NH_4Cl, 1 M KCl, 12 mM Na_2HPO_4, 1M KH_2PO_4), Stock B: (40 mM $MgCl_2.6H_2O$, 1M $MgSO_4.7H_2O$, 40 mM $CaCl_2.2H_2O$), Stock C: (2 M NaHCO3).

<u>طريقة العمل:</u>

- <u>اليوم الأول:</u>
- استنبات البروسيلا في 100 مل من وسط 2YT بالدرجة 37°م مدة 16 ساعة.
- إضافة 1 مل دم غنم في أنبوب 15 مل.
- إضافة 100 µl ماء اكسجيني فوق الدم، يحرك الأنبوب تحريك خفيف لأعلى وأسفل ويترك مدة دقيقتين، إضافة 15 مل من PBS 1X فوق الدم المفجر.
- تثقيل مدة عشر دقائق بسرعة 8000 rpm، التخلص من الطافي (يتم التخلص من الرغوة ثم الطافي بهدوء).
- إضافة 1 مل من محلول التفجير يمزج جيداً، إضافة 2 مل من محلول التفجير.
- حضن الأنبوب بالثلج مدة 10 دقائق ثم إكمال الحجم بالـ PBS 1X .
- تثقيل مدة 10 دقائق بسرعة 1200 rpm، التخلص من الطافي وحل الراسب بـ 1 مل من وسط الاستنبات RPMI.
- إجراء تعداد للخلايا ضمن صفيحة التعداد Thoma (HBG®) ويتم حساب المتوسط الحسابي لثلاث ساحات من الصفيحة تحت المجهر الضوئي (Nikon®).

- يتم حساب عدد الخلايا حسب المعادلة التالية:

  عامل التمديد X المتوسط الحسابي لثلاث ساحات X ثابت 2×10^5

- إضافة 100 μl من الخلايا بتعداد 1×10^5 ضمن صفيحة الاستنبات الخلوي (TPP10®).
- حضن بالدرجة 37° م مدة 16 ساعة وبوجود 5% CO_2.
- <u>اليوم الثاني:</u>
- تثفيل البكتيريا بسرعة 6000 rpm مدة 10 دقائق.
- التخلص من الطافي وحل الراسب بـ 1 مل PBS 1X.
- قياس تركيز البكتيريا على طول موجة 600 nm، حيث تعادل الـ (1) OD 600 بحدود 3×10^9.
- يتم التخلص من وسط الاستنبات من صفيحة الاستنبات الخلوي، ثم إضافة 100 μl من البكتيريا بتعداد 1×10^8 ضمن الصفيحة.
- إضافة 10 μl من الأضداد الموسومة بالفلوروسين ضمن الصفيحة.
- حضن بالدرجة 37° م مدة 30 دقيقة.
- تثبيت الخلايا بإضافة 3.7 % فورم ألدهيد، حضن مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
- تفجير الخلايا بإضافة Tritone % 1، حضن مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
- دراسة الخلايا تحت المجهر الضوئي المقلوب وباستخدام الفلتر الخاص بفلورة الفلوروسين.

الفصل الثالث

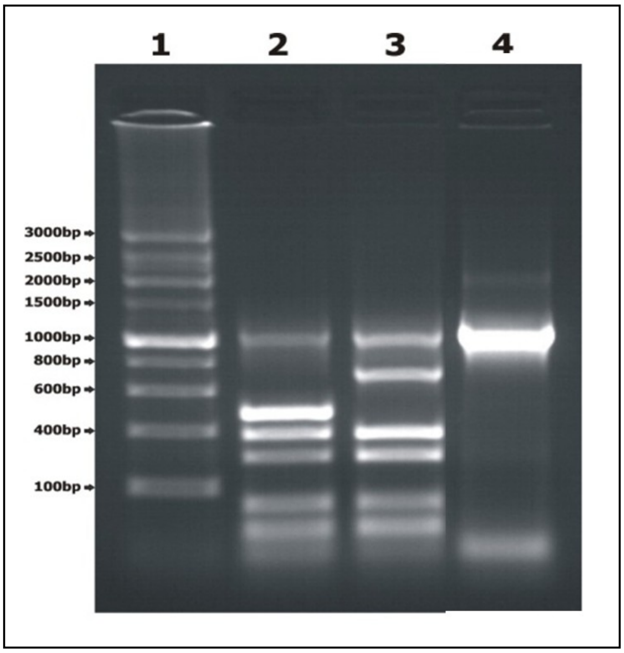
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

3. النتائج والمناقشة: Results and Discussion

1.3. تحديد نقاوة السلالات البكتيرية باستخدام الـ PCR

تم عزل الـ DNA الجينومي من السلالات البكتيرية ومن ثم تحديد تركيزه بغية استخدامه في نوع خاص من تفاعلات الـ PCR يدعى بتفاعل *Brucella* Multiplex PCR بغية التأكد من نقاوتها وتبعيتها لجنس البروسيلا من جهة ولكل من النوعين البروسيلا المجهضة والبروسيلا الضأنية من جهة أخرى. وقد تم استخدام اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 في ذات التفاعل كشاهد سلبي (الشكل 22). بنتيجة هذا التفاعل وبعد إجراء الترحيل على هلامة الأغاروز تظهر مجموعة من شدف الـ DNA الخاصة بجنس البروسيلا بطول (393 bp و 302) وتظهر شدفة مميزة للبروسيلا المجهضة بطول (498 bp) وأخرى مميزة للبروسيلا الضأنية بطول (792 bp) وذلك بحسب العينة البكتيرية التي أجري عليها التفاعل. أيضاً يظهر لدى كل السلالات المختبرة العصابة العامة (1000 bp) التي تنتج عن تضخيم المورثة (16S rRNA) الشديدة المحافظة في الجينوم البكتيري بشكل عام (الشكل. 22).



(الشكل 22): تمييز السلالات البكتيرية المستخدمة باستخدام تفاعل الـ PCR متعدد الشدف.

صورة لهلامة الأغاروز 1.5% بعد ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR المتعدد الشدف الذي أجري على الـ DNA المحضر من سلالتي البروسيلا المجهضة (مسار2) والضأنية (مسار3) وكذلك اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 (مسار4) التي استخدمت كشاهد سلبي. وقد تم تفاعل الـ PCR هذا باستخدام مرئسات نوعية لمورثات محافظة في جنسي البروسيلا واليرسينيا. الواسم الجزيئي للدنا DNA marker تم ترحيله في المسار(1).

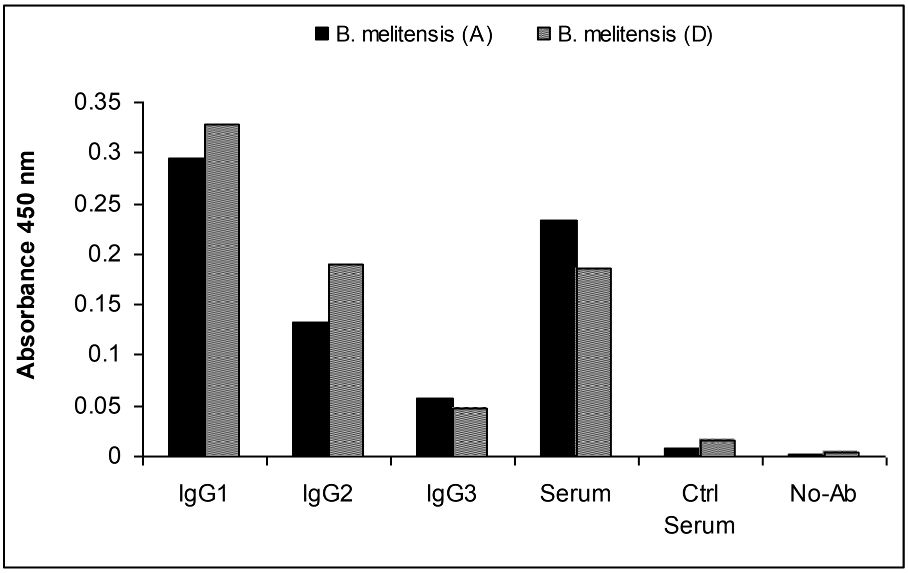
2.3. تحضير الخلاصات البروتينية العامة للبروسيلا لاستخدامها في البحث

لقد تم في أعمال سابقة تحضير مكتبة الأضداد النانوية المورثية من خلايا الجمل الممنع بخلاصات البروسيلا الضأنية العامة في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية. وقد امتازت هذه المكتبة باتساعها واحتوائها على نسبة عالية من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات أضداد نانوية بأطوال تقريبية نظامية. من هذه المكتبة تم عزل ثلاثة أشكال ضدية ذات نوعية متباينة لخلاصة البروسيلا البروتينية السيتوبلازمية باستخدام تقنية الفاجات العارضة، وجميعها كانت نوعية لكافة أنواع البروسيلا التي تم اختبارها (Abbady *et al*، قيد النشر).

إن كون هذه المكتبة المورثية قد إنشئت بعد التمنيع بخلاصة معقدة، بحيث يُنتقى منها تدريجيًا الأشكال الرابطة النوعية لبعض المكونات المفردة من هذه الخلاصة، أي بتعبير آخر مدى استمناعية كل من هذه المكونات (Saerens *et al*., 2008). لقد كانت فكرة هذا العمل أنه وباستخدام ذات المكتبة العامة، يمكننا عزل بعض الأضداد النانوية القادرة على ربط بعض المستضدات المميزة للبروسيلا الضأنية، وحتى لا تغيب أي من مكونات الخلية، والتي من بينها البروتينات الغشائية أو السيتوبلازمية وحتى الجدارية، عن نطاق البحث فقد لجأنا لطريقة خاصة لاستحصال المحتوى الخلوي العام لكل من البروسيلا الضأنية والمجهضة وذلك من خلال استخدام محلول موقي حاوي على تركيز عالي من الغوانيدين، وهذا المركب يعمل على حل الجدر والأغشية الخلوية وحلمهة جميع البروتينات والببتيدات وخاصة تلك ذات البنية الكارهة للماء، مثل البروتينات الغشائية، كما يمتلك أثراً تمسخياً على البروتينات بصورة جزئية وقد يكون في أغلب الأحيان غير عكوس، إضافة إلى قدرته على المحافظة على خصائص البروتينات العامة خلال فترات التخزين الطويلة وذلك من خلال أثره التثبيطي على معظم أنزيمات البروتياز (Hummon *et al*., 2007). من ناحية أخرى فإن وجود هذا المركب في الخلاصات البروتينية، وبتراكيزه العالية، لم يكن له أي أثر على تقنية المعايرة البروتينية (Bradford) من جهة أو حتى على كفاءة ارتباط البروتينات على صفيحة المقايسة المناعية الأنزيمية من جهة أخرى بما يمكن اعتباره بمثابة طريقة مثالية لتحضير البروتينات لمثل هذا النوع من الأعمال البحثية.

3.3. اختبار فعالية الأنواع المختلفة من أضداد مصل الجمل على الخلاصات البروتينية للبروسيلا

تحتوي عائلة الجمال، والتي تعود إليها الجمال الافريقية ذات السنم الواحد والآسيوية ذات السنمين وحتى حيوانات اللاما، في أمصالها إضافة للأضداد التقليدية نوع آخر من الأضداد ذات السلسلة الثقيلة والتي تشتق منها الأضداد النانوية (De Genst *et al.*, 2006). يمكن فصل هذه الأنواع المختلفة من الأضداد من المصل الدموي باستخدام الكروماتوغرافيا التفاضلية ذات الإلفة (protein A and G affinity chromatographic) (Hamers-Casterman et al., 1993). لقد تم فصل هذه المكونات الضدية المختلفة التقليدية (IgG1) وذات السلسلة الثقيلة (IgG2 and IgG3)، مُسبقاً من مصل الجمل الممنع وتم اختبار فعاليتها على الخلاصة العامة للبروسيلا (Abbady *et al*، قيد النشر). للتأكد من قدرة هذه الأضداد في التعرف على بروتينات البروسيلا المحضرة بطريقة الغوانيدين والبروتينات المستخلصة بالموقي الحال (Lysis buffer) فقد تم اختبارها جميعاً في تجربة للمقايسة المناعية الإنزيمية وتمت مقارنتها مع فعالية المصل ككل من الجمل الممنع ومن آخر شاهد جمل غير ممنع نحو بروتينات البروسيلا المستخلصة بالطريقتين (شكل 23). لقد أظهرت هذه التجربة قدرة مختلف الأشكال الضدية في التعرف على بروتينات البروسيلا بصورة فعالة مقارنة بفعالية المصل الشاهد حين غياب الأضداد (No Ab)، وقد أظهرت النتائج أيضاً قدرة الأضداد ذات السلسلة الثقيلة على ربط بروتينات البروسيلا والتي تعد المصدر المورثي للأضداد النانوية وبالتالي فإنه بالإمكان غربلة المكتبة المورثية للأضداد النانوية المحضرة مسبقاً من خلاصة البروسيلا الضأنية. كما لوحظ أن تمسيخ البروتينات بطريقة الغوانيدين لا يؤثر بقدرة الأضداد في التعرف على البروسيلا، ولوحظ أيضاً أن هذه الأضداد قادرة على ربط البروتينات المحضرة بطريقة الغوانيدين بصورة أفضل من البروتينات المحضرة بالطريقة التقليدية.



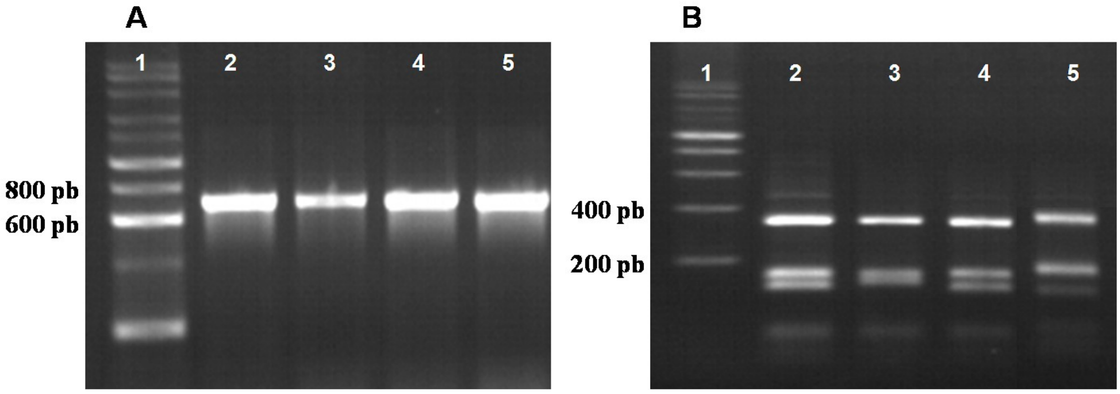
(الشكل 23): اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بخلاصة البروسيلا نحو البروتينات المنقاة.

اختبار الإليزا لتحديد فعالية مجموعة الأضداد المختلفة، التي تم تنقيتها من مصل دم الجمل الممنع بالبروسيلا، وذلك بغياب (No Ab) أو وجود البروتينات المحضرة من البروسيلا بطريقة الموقي الحال (A) وبطريقة الغوانيدين (D). وقد استخدم المصل ككل (بتمديد 1/5000) من جمل ممنع (+) وآخر شاهد (–) للمقارنة وكان الشرط (No Ab) بمثابة دليل على غياب الفعالية بغياب الأضداد.

4.3. غربلة المكتبة المورثية بتقنية الفاجات العارضة

تعتبر تقنية الفاجات العارضة من أشهر التقنيات التي تستخدم بغرض العزل الإنتقائي لبعض الأشكال الرابطة الفعالة انطلاقاً من مكتبات مورثية عالية التنوع (Clackson *et al.*, 1991). لقد كان استخدام هذه التقنية مركزاً في السابق على عزل الأضداد المؤشبة الناتجة عن دمج المجالين المتنوعين لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة من الأضداد العادية أو مايعرف اختصاراً بالـ scFv. أيضاً تم بنجاح مؤخراً عزل عدد من هذه الأضداد المؤشبة النوعية للبروسيلا بالرغم من المشاكل التي نشأت والمتعلقة بانحلاليتها وثباتيتها (Hayhurst *et al.*, 2003). توفر تقنية الأضداد النانوية حلاً بديلاً لمثل هذه المشاكل التي ترافق إنتاج شدف الأضداد المؤشبة العادية، ولدى دمجها بالمكتبة المورثية الاستمناعية وتقنية الفاجات العارضة فإنه يمكننا عزل العديد من الأضداد ذات النوعية العالية والثباتية (Wesolowski *et al.*, 2009). في هذا العمل، لجأنا للأسلوب الطرحي باستخدام تقنية الفاجات العارضة، حيث أنه وانطلاقاً من المكتبة المورثية ذاتها، طبقنا تقنية الفاجات العارضة بداية على الخلاصات البروتينية للبروسيلا المجهضة ومن ثم استرجعنا كامل الفاجات العارضة للأضداد النانوية غير المرتبطة لنعزل منها الأشكال الضدية النوعية للخلاصات البروتينية المحضرة من البروسيلا الضأنية. أثمرت هذه الطريقة في الحصول على العديد من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات كاملة للأضداد النانوية بحيث تقع أطوالها ضمن المجال المتوقع (700 pb) كما أكده اختبار الـ PCR باستخدام مرئستين (المرئسة الموجهة RP والمرئسة العكسية

GIII) مطوقتين لموقع مورثة الضد النانوي في بلازميد pHEN4، وبشكل عام كانت جميعها تتبع لواحد من أربعة أشكال ضدية متكررة (شكل 24A). بالرغم من أن بعض مورثات الأضداد النانوية تلك تبدي تشابه الهيئة الشدفية التي نتجت بتقطيعها بأنزيم التقييد (HinfI) (شكل 24B)، والتي تعد طريقة تقليدية سريعة لكشف أختلاف – وليس بالضرورة تشابه – الأنماط الضدية النانوية المعزولة، فإن تفاعل السلسلة (sequencing) لمورثات الأضداد النانوية المنتقاة أكد اختلافها جميعا فيما بينها.



(الشكل 24): التأكد من مورثات الأضداد النانوية المنتقاة

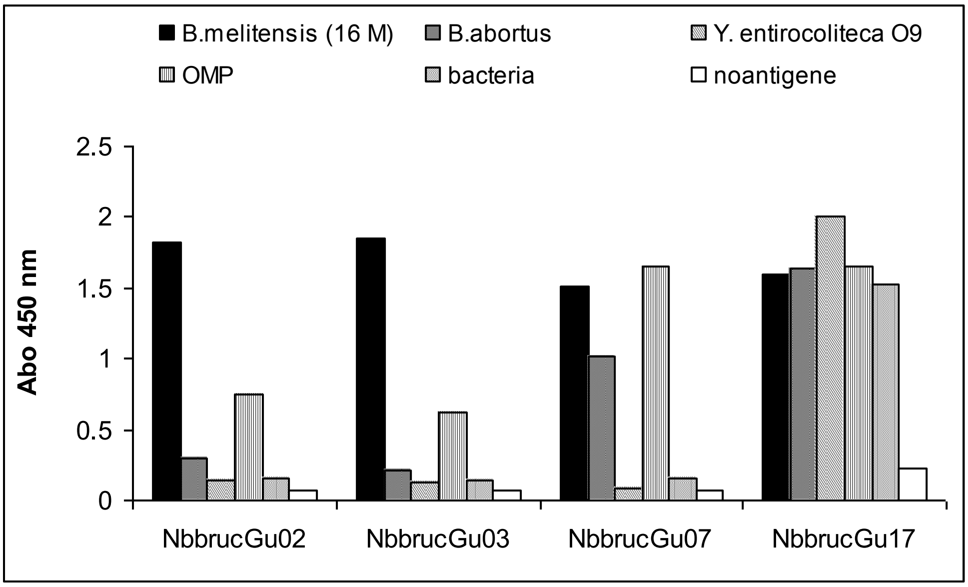
(A) ناتج الـ PCR باستخدام المرئيستين RP, GIII حيث يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي (DNA marker) وتحوي باقي المسارات على شدف DNA المضخمة، الحاوية على مورثات الأضداد النانوية، من المستعمرات البكتيرية الأربع و جميع هذه العصابات لها ذات الطول تقريباً. (B) بعد تضخيم مورثات الأضداد النانوية تم تقطيعها بأنزيم التقييد Hinf1 ومن ثم ترحيلها عبر هلامة الأغاروز. يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي (DNA marker)، بينما تحوي المسارات الأخرى شدف DNA الناتجة عن عملية قطع مورثة الأضداد النانوية من كل من المستعمرات الأربع المنتقاة.

فقد أوضح تحليل التسلسل النكليوتيدي لهذه الأضداد النانوية تشابهاً كبيراً فيما بينها باستثناء ثلاثة مواقع داخلية تختلف فيها فيما بينها وهي ما تعرف بعرى التتامية (CDR) التي يتيح إلتقاؤها فيما بينها تشكيل الجيب الذي يرتبط به الضد مع المستضد.

5.3. اختبار نوعية الأضداد النانوية المعروضة على سطح الفاجات نحو مستضدات البروسيلا

في الخطوة التالية تم اختبار نوعية هذه الأضداد النانوية المرمزة من قبل المورثات التي تحويها المستعمرات البكتيرية الأربع المعزولة بتقنية الفاجات العارضة وذلك نحو مستضدات البروسيلا. لهذه الغاية تم استخدام طريقة تعتمد على إنتاج هذه الأضداد على شكل بروتينات معروضة على سطح الفاجات واستخدامها ككل في تفاعل المقايسة المناعية الإنزيمية، وقد تم التحقق من حدوث الارتباط بين الضد النانوي المعروض والمستضد المثبت باستخدام الضد النوعي للفاج (Anti-M13-HRP). أجري هذا الاختبار على مجموعة من المستضدات البكتيرية المحضرة من كل من البروسيلا الضأنية والمجهضة، كما تم استخدام المستضدات المحضرة من اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 كشاهد سلبي وذلك نظراً للشبه الكبير الذي تبديه مع البروسيلا (Khdrawi *et al.*, 2010)، كما تم اختبارها على بروتينات الغشاء الخارجي (OMP) للبروسيلا الضأنية وبكتيريا البروسيلا الضأنية ككل بدون تحطيم. تبين بنتيجة الاختبار أن جميع الأضداد النانوية من المستعمرات البكتيرية الأربع قادرة على ربط مستضدات البروسيلا الضأنية والتعرف عليها مقارنة بالشاهد السلبي بدون مستضد. من ناحية أخرى، يمكن اعتبار الأضداد النانوية من المستعمرات NbbrucGu02 وNbbrucGu03 وNbbrucGu07 نوعية للبروسيلا فقط. بينما تلك من المستعمرة رقم NbbrucGu17 عامة للبروسيلا واليرسينيا. بصورة فريدة، يمكن للضدين النانويين من المستعمرتين رقم NbbrucGu02 وNbbrucGu03 التمييز بوضوح بين نوعي البروسيلا الضأنية والمجهضة وبالتالي يمكن اعتبارهما أنهما نوعيين للبروسيلا الضأنية فقط، كما أن لها القدرة على التعرف على بروتينات الغشاء الخارجي وإن كان بصورة أقل بالمقارنة مع الضد النانوي من المستعمرة NbbrucGu07، في حين أنها لم تستطع التعرف على البروسيلا الضأنية كبكتيريا كاملة في حين أن الضد النانوي من المستعمرة NbbrucGu17 كانت له القدرة على التعرف على البكتيريا ككل (الشكل 25).

وكما ذكرنا سابقاً تتألف الطبقة الخارجية للجدار الخلوي في البكتيريا سالبة الغرام من متعدد السكاريد اللبيدي وبروتينات (المعطف وعديد السكاريد– O واللبيد– A) وتُغطى بعدة طبقات رقيقة من ببتيدوغليكان Peptidoglycan (يشكل الببتيدوغليكان الطبقة الخارجية للجدار الخلوي) (Costerton *et al.*, 1974)، وهذا ما يفسر قدرة الأضداد النانوية الثلاث الأولى على ربط بروتينات الغشاء الخارجي المعزولة بشكل نقي مقارنة مع البكتيريا ككل بدون تحطيم لأن طبقة الببتيدوغليكان تمنعها من الارتباط بهذه البروتينات.



(الشكل 25): اختبار نوعية الأضداد النانوية المعروضة على سطح الفاجات نحو مستضدات البروسيلا.

يمثل الشكل نتائج اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية لتحديد قدرة الفاجات العارضة لكل من الأضداد النانوية الأربعة، بعد إنتاجها من مستعمراتها البكتيرية، على التعرف على المستضدات (10µg/well) المحضرة من نوعين من جنس البروسيلا (هما الضأنية والمجهضة) وكذلك قدرتها على تمييز مستضدات البروسيلا عموماً عن اليرسينيا. أيضا في التعرف على بروتينات الغشاء الخارجي (OMP) للبروسيلا الضأنية وبكتيريا البروسيلا الضأنية ككل بدون تحطيم وقد تم كشف ارتباط الأضداد النانوية النوعي بالمستضدات باستخدام الضد anti-M13 الموسوم بالبيروكسيداز.

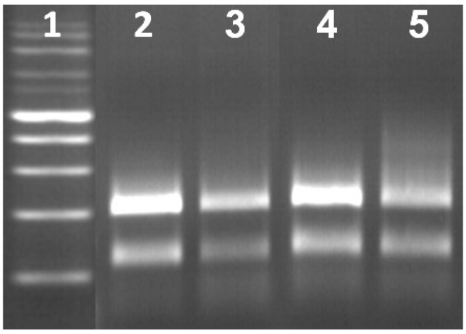
6.3. إعادة تنسيل الأضداد النانوية في بلازميد التعبير البروتيني

بعد التأكد من تسلسل مورثات الأضداد النانوية الثلاث المنتقاة وذلك بوساطة السلسلة، تم عزل مورثات هذه الأضداد من الفاجميد (pHEN4) وذلك من أجل تنسيلها من جديد في البلازميد (pHEN6)، وهذا البلازميد يسمح بالتعبير عن البروتينات بكميات كبيرة في البكتيريا *E.coli* Wk6 ويكون ناتج التعبير البروتيني حاوي في الطرف الأميني على ذيل من ست أحماض هيسيتيدين أمينية (6xHIS). إنَّ هذه الخاصية تسمح بتنقية البروتين المعبر عنه (الضد النانوي) مخبرياً باستخدام تقنية الفصل بالأعمدة المشبعة بشوارد النيكل المعروفة بإلفتها العالية لأحماض الهيسيتيدين الأمينية السداسية.

1.6.3. عزل وتقطيع مورثات الأضداد النانوية باستخدام أنزيمات التقييد:

أُستخلص الفاجميد (pHEN4) الحاوي مورثات الأضداد النانوية من المستعمرات البكتيرية النامية على طبق البتري بوجود الغلوكوز والأمبسلين، حيث تم استخلاص البلازميد بوساطة تقنية الـ Miniprep. ومن ثم تم تضخيم مورثات الاضداد النانوية بتفاعل الـ PCR باستخدام المرئستين (المرئسة الموجهة RP والمرئسة العكسية GIII).

فيما بعد تم تقطيع ناتج التضخيم بأنزيمي التقييد الـBstEII والـPstI بهدف تنسيل هذه المورثات في بلازميد التعبير البروتيني (pHEN6)، تم ترحيل ناتج القطع على هُلامة آغاروز 1.5 %، وتم الحصول على عُصابتين، تمثل العُصابة ذات الطول 400 bp تقريباً مورثات الأضداد النانوية، في حين تظهر العُصابة بطول 300 bp شدف الـDNA الطرفية لمورثة الضد النانوي (الشكل 26).



(الشكل 26): ناتج قطع مورثات الأضداد النانوية

بعد تضخيم مورثات الأضداد النانوية تم تقطيعها بأنزيمي التقييد الـBstEII والـPstI ومن ثم ترحيلها عبر هلامة الأغاروز حيث يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي بينما تحوي المسارات الأخرى شدف DNA الناتجة عن عملية قطع مورثات الأضداد النانوية من كل من المستعمرات الأربع المنتقاة.

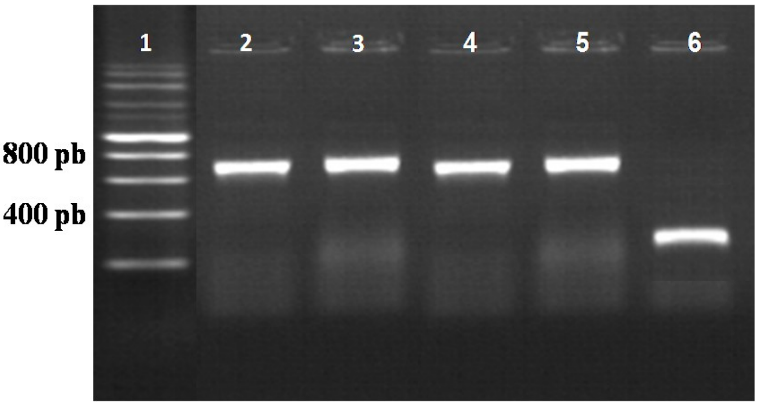
2.6.3. تنقية مورثات الأضداد النانوية وربطها بالبلازميد (pHEN6)

بعد مُعاملة كلٍ من مورثات الأضداد النانوية وبلازميد التعبير المورثي الـ (pHEN6) بأنزيمات التقييد، تم ترحيل كلٍ منهما على هُلامة أغاروز 1.5 %، ثم قص الشدفتين وتنقيتهما باستخدام طاقم الـ Promega Wizadr ® SV Gel and PCR clean-up system، ومن ثم قيس تركيز كلٍ من مورثات الأضداد النانوية وبلازميد الـ (pHEN6) باستخدام جهاز الـ NanoDrop والذي بلغ: 35 ng \ ml و 72.3 ng \ ml على التوالي. ثم تم الانتقال إلى المرحلة التالية وهي ربط المورثة إلى البلاسميد باستخدام أنزيم الربط Ligase T4.

3.6.3. التحوير البكتيري

أُتبع ربط مورثات الأضداد النانوية إلى البلازميد pHEN6، إدخال البلازميد الحاوي على المورثة إلى سُلالات بكتيريا الـ *E. coli* Wk6، بهدف تنسيل المورثات ضمن البلازميد. ثم تم التأكد من نجاح عملية التحوير البكتيري من خلال تنمية المُستعمرات البكتيرية على أوساط انتقائية تحتوي على الأمبسلين، والذي يسمح بنمو البكتيريا الحاوية على البلازميد فقط. ومن ثم إجراء تفاعل الـ PCR باستخدام المرئستين (المرئسة الموجهة RP والمرئسة العكسية FP) على المستعمرات البكتيرية الحاوية على التراكيب البلازميدية التي تم تحويرها. ولدى ترحيل ناتج التضخيم على هلامة أغاروز 1.5 %، تم الحصول على

نوعين من العصابات، حيث أن العصابات بطول 580 bp تقريباً تمثل شدف الـ DNA المضخمة انطلاقاً من المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلازميد الذي يحوي مورثة الضد النانوي، في حين أن العصابات بطول 260 bp تمثل شدف الـ DNA المضخمة انطلاقاً من المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلازميد الذي لا يحوي مورثة الضد النانوي (الشكل 27).



(الشكل 27): تفاعل الـ PCR للمستعمرات البكتيرية الحاوية البلازميد (pHEN6)

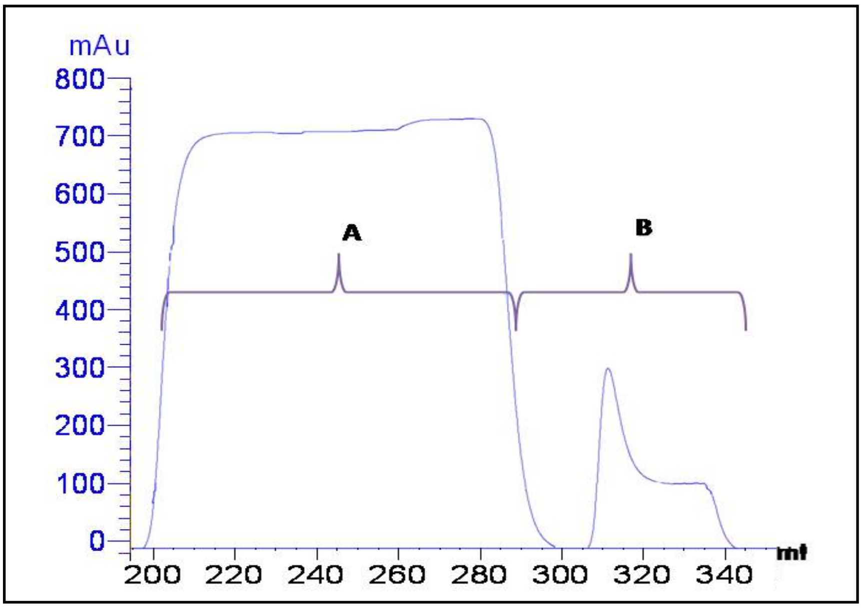
بعد عملية التحوير البكتيري تم إجراء تفاعل الـ PCR لعدد من المستعمرات البكتيرية باستخدام المرئستين (RP,FP) ومن ثم ترحيلها عبر هلامة الأغاروز حيث يمثل المسار الأول واسم DNA الجزيئي وتمثل المسارات (2 و3 و4 و5) شدف DNA الحاوية مورثات الأضداد النانوية التي تم تضخيمها انطلاقا من كل من المستعمرات البكتيرية المنتقاة، بينما يمثل المسار السادس شدف الـDNA المضخمة انطلاقاً من مستعمرة بكتيرية شاهده حاوية على بلازميد خالي من مورثة الضد النانوي.

7.3. التعبير البروتيني

بعد انتقاء عدد من المستعمرات البكتيرية الحاوية على التراكيب البلازميدية لمورثات الأضداد النانوية الثلاث تم زرعها في وسط سائل وبوجود الصاد الإنتقائي ذاته وفي شروط التنمية المناسبة. بعد عملية الزرع السائلة للبكتيريا تم إضافة المادة المحرضة (IPTG) وهي عبارة عن مركب كيميائي يقوم بتحفيز محضض (promoter) المورثة الموجودة في البلازميد بما يوجه بنسخ المورثة الخاضعة له (مورثة الضد النانوي) و من ثم التعبير عن بروتينها وتراكمها في الخلايا البكتيرية.

بعد تنمية السلالات البكتيرية الحاملة لمورثات الأضداد النانوية الثلاث تم ترسيب البكتيريا وحلها ومن ثم استحصال الخلاصة البكتيرية ثم ترحيل جزء منها على هلامة عديد الأكريلاميد قبل وبعد عملية التحريض. ثم تم تمرير الخلاصة البكتيرية الحاوية على بروتينات الأضداد النانوية الثلاث، ممزوجة بالمحتوى البروتيني للبكتيريا، على عمود فصل مشبع بشوارد النيكل وذلك باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة. تتثبت على هذا العمود بروتينات الأضداد النانوية نظراً لاحتوائها على ذيل الهيستيدين السداسي ذو الإلفة العالية لشوارد النيكل في حين أن البروتينات المتبقية في الخلاصة تغادر العمود مع سائل

الغسل. بعد مرحلة مستفيضة من الغسل بالمحلول الموقي للتأكد من خروج كامل البروتينات غير مثبتة، تم فصل واستحصال بروتين الضد النانوي من العمود باستخدام محلول موقي يحتوي على مركب كيميائي (إيميدازول) له صيغة كيميائية ذات إلفة عالية ذات إلفة لشوارد النيكل تمكنه من التنافس مع زمرة الهيستيدين السداسية. ويوضح (الشكل 28) تغير امتصاصية الضد النانوي رقم 7 بعد خروجه من عمود التنقية المشحون بالنيكل وباقي الأضداد النانوية تمثل نفس الشكل.



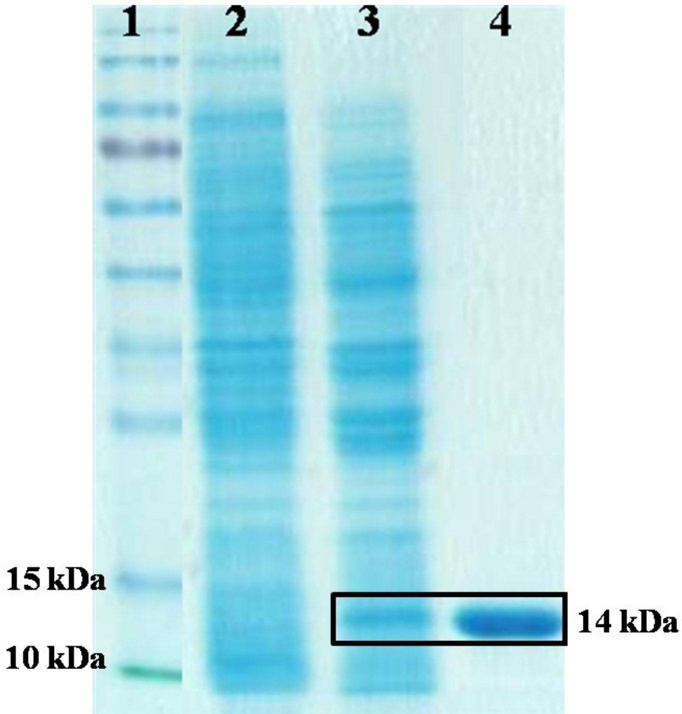
(الشكل 28): تنقية الأضداد النانوية باستخدام أعمدة الفصل المشحونة بشوارد النيكل

يظهر الشكل تغير امتصاصية العينة بعد خروجها من عمود التنقية المشحون بالنيكل، لدى تمرير الخلاصة البكتيرية الحاوية على بروتين الضد النانوي على عمود فصل مشبع بشوارد النيكل، يتثبت بروتين الأضداد النانوية في حين أن الغالبية العظمى المتبقية من بروتينات الخلاصة تغادر العمود مع سائل الغسل (المجال A)، يتم فصل بروتين الضد النانوي عن العمود وتجميعه باستخدام موقي يحتوي على إيميدازول (المجال B).

بعد عملية التنقية تمت ديلزة الأضداد النانوية الثلاث المنقاة للتخلص من المكونات الملحية المرافقة لعملية التنقية ومن ثم قيست تراكيزها باستخدام جهاز الـ NanoDrop، بلغ تركيز الضدين النانوين رقم 7 و 3 2 mg/ml بينما بلغ تركيز الضد النانوي رقم 2 1 mg/ml.

8.3. ترحيل الأضداد النانوية على هلامة عديد الأكريلاميد

بعد حساب تركيز الأضداد النانوية تم ترحيلها على هُلامة الرحلان الكهربائي دودسيل سلفات الصوديوم عديد الأكريلاميد SDS – PAGE 12 %، حيث تم تحديد الوزن الجزيئي للبروتينات الثلاث حوالي 14 kDa بالمُقارنة مع واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية (الشكل. 29).

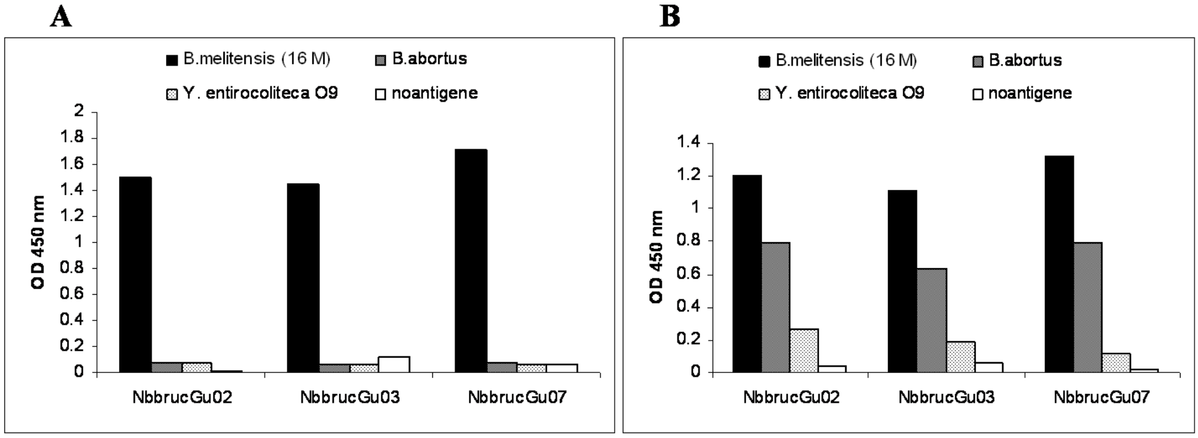


(الشكل. 29): ناتج ترحيل البروتين على هلامة عديد الاكريلاميد.

يظهر الشكل ناتج ترحيل بروتين الضد النانوي رقم 7 حيث يمثل المسار الأول واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية، والمسار الثاني المستعمرات البكتيرية الحاوية على الأضداد النانوية قبل عملية التحريض البروتيني، والمسار الثالث المستعمرات البكتيرية بعد 16 ساعة من عملية التحريض بإضافة، والمسار الرابع بروتين الضد النانوي النقي وبطول 15 kDa.

9.3. وسم الأضداد النانوية واختبارها بالمقايسة المناعية الأنزيمية:

بعد الحصول على الأضداد النانوية النقية تم وسمها بمادة البيوتين، ويعتبر البيوتين نظام ثنائي الكشف ذو إلفة عالية للـ Streptavidin. بعد عملية الوسم الموضحة في طرائق ومواد البحث أعلاه تم إجراء تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية على كل من الأضداد النانوية الموسومة والأضداد النانوية المنقاة على مستضدات البروسيلا الضأنية والمجهضة، والمستضدات المحضرة من اليرسينيا كشاهد سلبي. وقد تم التحقق من حدوث الارتباط بين الضد الموسوم والمستضد باستخدام Streptavidin النوعي للبيوتين. واستخدام (anti-HIS) الموسوم بالبيروكسيداز النوعي لذيل عديد الهستيدين للتحقق من نوعية الضد النانوي النقي (الشكل 30).



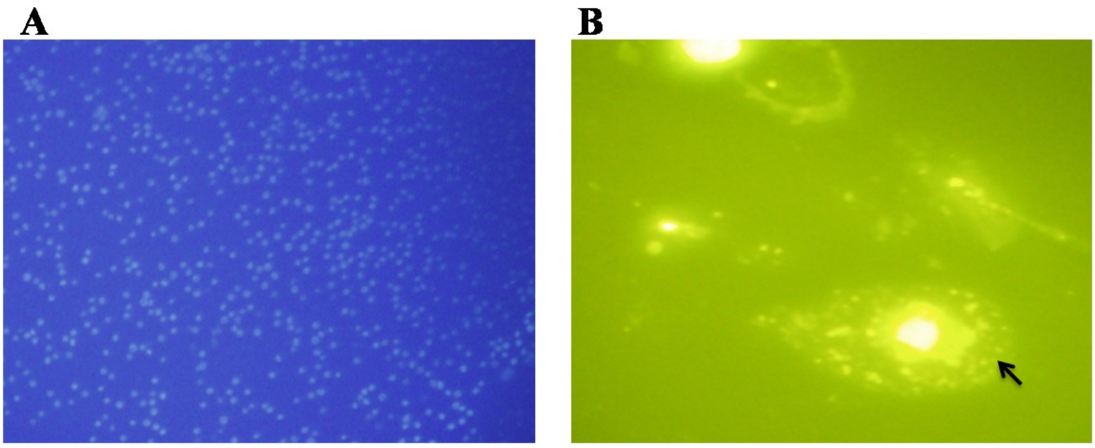
(الشكل 30): اختبار نوعية الأضداد النانوية المنقاة والموسومة نحو مستضدات البروسيلا.

يمثل الشكل نتائج اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية لتحديد نوعية الأضداد النانوية المنقاة (A) والموسومة (B) للتعرف على المستضدات (25 µg/well) المحضرة من نوعين من جنس البروسيلا (هما الضأنية والمجهضة) وكذلك قدرتها على تمييز مستضدات البروسيلا عموما عن اليرسينيا. تم كشف ارتباط الأضداد النانوية النقية بالمستضدات باستخدام anti-HIS الموسوم بالبيروكسيداز. والأضداد النانوية الموسومة باستخدام Streptavidin.

تبين بنتيجة الاختبار أن الأضداد النانوية الثلاث قادرة على ربط مستضدات البروسيلا الضأنية والتعرف عليها مقارنة بالشاهد السلبي بدون مستضد. لكن لوحظ أن هذه الأضداد النانوية الثلاث NbbrucGu02 وNbbrucGu03 وNbbrucGu07 المنقاة قادرة على تمييز نوعي البروسيلا الضأنية والمجهضة وبالتالي يمكن اعتبارها نوعية للبروسيلا الضأنية فقط. من ناحية أخرى تمكنت جميع هذه الأضداد النانوية عندما وسمت بالبيوتين من ربط مستضات البروسيلا الضأنية إلا أنها فقدت قدرة التمييز بينها وبين المجهضة، كما أن الوسم أدى إلى زيادة ملحوظة بالـ Background. يمكن أن نعزي هذا الأمر أن عملية الربط تلك تمت باستخدام تفاعل كيميائي لإضافة زمر البيوتين بصورة عشوائية للضد النانوي بما قد يؤدي إلى تغيير البنية الفراغية للمنطقة الرابطة للمستضد من بنية الضد النانوي بحيث تسمح له بالارتباط بمجال أوسع من المعينات المستضدية مما يضعف من نوعية هذا الضد. للتغلب على هذه المشكلة وفي نفس الوقت الحصول على ضد نانوي موسوم وجاهز للاستخدام في العديد من التطبيقات يمكن اللجوء إلى طرائق الهندسة الوراثية الموجهة ، حيث يمكن دمج مورثة الأضداد النانوية بمورثة أنزيم (كأنزيم الفوسفاتاز القلوية Alkaline Phosphatase) أو بروتين مفلور (GFP) ضمن بنية بلازميدية قابلة للتعبير البروتيني في الخلايا البكتيرية بحيث نحصل مباشرة على بروتين مؤشب رابط للمستضد المدروس من جهة وقابل للكشف المباشر من خلال الجزيء الفعال المرتبط به من جهة أخرى (Kirchhofer *et al.*, 2010).

10.3. اختبار نوعية الأضداد النانوية نحو البروسيلا ضمن البالعات الكبيرة

لاختبار قدرة الأضداد النانوية الثلاث على كشف البالعات المخموجة بالبروسيلا تم وسمها بمادة الفلورسين، ومن ثم تم توجيهها للخلايا البالعة المصابة بالبروسيلا الضأنية (الشكل 31). تبين الاختبار قدرة هذه الأضداد على كشف البالعات المصابة حيث ظهرت البالعات المخموجة باللون الأخضر، بالمقارنة مع الشاهد السلبي الذي يمثل البالعات الكبيرة غير المصابة.



(الشكل 31): كشف البالعات المخموجة بالبروسيلا باستخدام الأضداد النانوية الموسومة بالفلوروسين

يمثل الشكل نتائج اختبار الضد النانوي رقم 7 بالموسوم بالفلوروسين لتحديد قدرته على ربط البروسلا ضمن البالعات حيث يمثل الشكل (A) البالعات غير المصابة بالبروسيلا والتي استخدمت كشاهد سلبي بينما يمثل الشكل (B) البروسيلا الموسومة المشار عليها بالسهم.

وهناك بعض الدراسات التي استخدمت أضداد وحيدة النسيلة موجهة نحو بروتينات البروسيلا حيث قام العالم Cloeckaert وزملائه عام 1996 من إنتاج أضداد وحيدة النسيلة للبروتينات السيتوبلاسمية للبروسيلا الضأنية ذات الأوزان الجزيئية 12 و24 و28 كيلو دالتون (CP12 وCP24 وCP28) (Cloeckaert *et al.*, 1996). وقام الباحث المريري وزملائه عام 2001 من إنتاج أضداد وحيدة النسيلة ضد البروتين السيتوبلازمي P39 (Al-Mariri *et al.*, 2001b). واعتبرت هذه الأضداد ذات قيمة لتطوير الاختبارات التشخيصية لداء البروسيلات الضأني.

لقد تمكنا في هذا البحث ولأول مرة من إنتاج أضداد نانوية نوعية للبروسيلا الضأنية في حين أن معظم الدراسات السابقة اعتمدت في التمييز بين أنوع البروسيلا على أضداد وحيدة النسيلة للتمييز بين البروسيلا واليرسينيا ذات النمط المصلي O9 تستهدف بصورة حصرية متعدد السكاريد اللبيدي الذي يعد من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية في بنية البروسيلا (Laurent *et al.*, 2004).

وقد استخدمت الأضداد النانوية في التشخيص والعلاج من الأمراض التي تسببها البكتيريا والطفيليات، فقد قام العالم Deckers وزملائه عام 2008 بعزل أضداد نانوية لداء الكيسات المذنبة Cysticercosis والذي تسببه الدودة الشريطية المسلحة *Taenia solium*، حيث وجد أن هذه الأضداد النانوية ذات نوعية عالية للبروتينات المحضرة من الدودة الشريطية العزلاء وكانت هذه الأضداد غير قادرة على تمييز البروتينات المحضرة من الشريطية العزلاء *T. saginata* و *T. Hydatigena* والمشعرة المهبلية *Trichinella spiralis* كما أكده تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية، وبالتالي بالإمكان استخدام هذه الأضداد كأدوات للتشخيص في البلدان التي يكون فيها داء الكيسات المذنبة متوطناً (Deckers *et al.*, 2009).

وفي دراسات أخرى استخدمت الأضداد النانوية لعلاج تسوس الأسنان والذي تسببه بكتيريا المكورات العقدية *Streptococcus mutans* حيث تمكن الباحثون من إنتاج أضداد نانوية دعيت S36-VHH موجهة نحو مستضدات المكورات العقدية لوحدها أو مدمجة بالغلوكوز اوكسيداز (GO_X) واستخدمت لمعالجة فئران التجربة حيث لوحظ انخفاض ملحوظ لنخر الأسنان السطحي الناعم (Kruger *et al.*, 2006).

تتبين مما سبق أن الأضداد النانوية التي تم تحضيرها في دراستنا يمكن أن تكون بمثابة أدوات فعالة لتمييز البروسيلا الضأنية في الاختبارات التشخيصية.

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Commendation

4. الاستنتاجات و التوصيات

لوحظ أن هناك ازدياد بتعداد مرضى الحمى المالطية في مختلف أنحاء القطر العربي السوري، كما أن هناك ازدياد بنسبة الإجهاض عند الأبقار والأغنام بشكل ملحوظ. إن أحد الأسباب المباشرة لزيادة عدد المرضى يعود لعدم وجود طريقة تشخيصية صحيحة تؤكد الإصابة بالبروسيلا، لأن معظم طرائق التشخيص تعتمد على الأضداد الموجهة نحو متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا مما يؤدي إلى تفاعلات مصلية كاذبة بسبب تشابه متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا مع متعدد السكاريد اللبيدي لبعض الأنواع البكتيرية الأخرى كاليرسينيا والسالمونيلا والاشريكية الكولونية. لذلك كانت الحاجة ماسة إلى البحث عن طريقة تشخيصية جديدة وأكثر دقة ونوعية للبروسيلا. وقد أثمرت نتائجنا في الحصول على أضداد نانوية نوعية لبروتينات البروسيلا وقادرة على تمييزها عن البكتيريا الأخرى بكفاءة عالية بحيث يمكن استخدامها مستقبلاً في التشخيص النوعي لداء البروسيلات.

في المرحلة القادمة من البحث يمكن التركيز على عدد من النقاط الهامة مثل:

- دراسة معمقة لخصائص الأضداد النانوية التي حصلنا عليها لتحديد التركيز الانسب لاستخدام كل منها.
- غربلة المكتبة المورثية للأضداد النانوية التي تم الحصول عليها وذلك من أجل إيجاد أضداد نانوية أخرى نوعية للبروسيلا. بالإضافة إلى إيجاد أضداد نانوية قادرة على تمييز البروسيلا عن الأجناس البكتيرية الأخرى.
- دراسة القدرة التثبيطية للأضداد النانوية التي حصلنا عليها في كبح أو منع الإصابة بالبروسيلا في البالعات في أوساط الزرع الخلوية.
- دراسة أثر الحماية للأضداد النانوية التي تم الحصول عليها ضد البروسيلا في المناعة المنفعلة، عن طريق حقن الفئران بالضد النانوي أولاً ثم بالبروسيلا للتأكد من فعاليتها في القضاء على البروسيلا، أملاً في تطوير لقاحات أو أساليب علاجية ناجعة للبروسيلا.
- استخدام الأضداد النانوية لتحديد المعينات المستضدية في البروسيلا القادرة على استثارة الجهاز المناعي، فهي تكون بمثابة معينات استمناعية يمكن استخدامها في التشخيص أو العلاج.
- الوسم الوراثي الموجه للأضداد النانوية بوساطة عمليات التنسيل والتعبير البروتيني.

الفصل الخامس

المراجع

References

5. المراجع:

1. Al-Attas, R.A., Al-Khalifa, M., Al-Qurashi, A.R., Badawy, M., and Al-Gualy, N. (2000) Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. *Ann Saudi Med* **20**: 224-228.
2. Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K., and Letesson, J.J. (2001a) Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* **69**.4822-4816 :
3. Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godfroid, J., Walravens, K., and Letesson, J.J. (2001b) Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of Brucella spp. *Infect Immun* **69**: 6264-6270.
4. Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrate, P., Mertens, P., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2002) Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun* **70**: 1915.1923-
5. Al-Mariri, A. (2008) Ultraviolet C lethal effect on Brucella melitensis. *New Microbiol* **31**: 47-55.
6. Al-Mariri, A. (2010) Protection of BALB/c mice against Brucella melitensis 16 M infection induced by vaccination with live Escherchia coli expression Brucella P39 protein. *Vaccine* **28**: 1766-1770.
7. Almuneef, M., and Memish, Z.A. (2003) Prevalence of Brucella antibodies after acute brucellosis. *J Chemother* **15**: 148-151.
8. Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414**: 521-526.
9. Baldwin, S.L., D'Souza, C., Roberts, A.D., Kelly, B.P., Frank, A.A., Lui, M.A., Ulmer, J.B., Huygen, K., McMurray, D.M., and Orme, I.M (1998) .Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun* **66**: 2951-2959.
10. Baral, T.N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., Muyldermans, S., and De Baetselier, P. (2006) Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* **12**: 580-584.
11. Boschiroli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**: 58-64.
12. Burton, D.R., and Woof, J.M. (1992) Human antibody effector function. *Adv Immunol* **51**: 1-84.
13. Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003) Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**: 545-556.
14. Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-628.

15. Cloeckaert, A., H. S. Debbarh, *et al*. (1996) Production and characterisation of monoclonal antibodies to Brucella melitensis cytosoluble proteins that are able to differentiate antibody responses of infected sheep from Rev. 1 vaccinated sheep. *J Med Microbiol* **45**: 206-13.
16. Conrath, K.E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A ,.Frere, J.M., Kinne, J., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2807-2812.
17. Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**: 213-221.
18. Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., and Revets, H. (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* **64**: 2853-2857.
19. Costerton, J. W., J. M. Ingram, et al. (1974) Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 87-110.
20. Davis, A.T. (2000) Monoclonal antibody-based therapy of lymphoid neoplasms: what's on the horizon? *Semin Hematol* **37**: 34-42.
21. de Bagues, M.P., Ouahrani-Bettache, S., Quintana, J.F., Mitjana, O., Hanna, N., Bessoles, S., Sanchez, F., Scholz, H.C., Lafont, V., Kohler, S., and Occhialini, A. (2005) The new species Brucella microti replicates in macrophages and causes death in murine models of infection. *J Infect Dis* **202**: 3-10.
22. De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2006) Antibody repertoire development in camelids .*Dev Comp Immunol* **30**: 187-198.
23. Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., Vercruysse, J., Muyldermans, S., and Dorny, P. (2009) Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of Taenia solium cysticercosis .*Int J Parasitol* **39**: 625-633.
24. Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., and Wyns, L. (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* **3**: 803-811.
25. Dowd, C.S., Zhang, W., Li, C., and Chaiken, I.M. (2001) From receptor recognition mechanisms to bioinspired mimetic antagonists in HIV-1/cell docking. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **753**: 327-335.
26. Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A ,.Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* **11**: 500-515.
27. Dumoulin, M., Last, A.M., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D ,.Larsson, G., Spencer, A., Archer, D.B., Sasse, J., Muyldermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C.V., and Dobson, C.M. (2003) A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* **424**: 783-788.
28. El Miedany, Y.M., El Gaafary, M., Baddour, M., and Ahmed, I. (2003) Human brucellosis: do we need to revise our therapeutic policy? *J Rheumatol* **30**: 2666-2672.
29. Frenken, L.G., van der Linden, R.H., Hermans, P.W., Bos, J.W., Ruuls, R.C., de Geus, B., and Verrips, C.T. (2000) Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. *J Biotechnol* **78**: 11-21.

30. Gupta, S., Arora, K., Sampath, A., Khurana, S., Singh, S.S., Gupta, A., and Chaudhary, V.K (1999) .Simplified gene-fragment phage display system for epitope mapping. *Biotechniques* **27**: 328-330, 332-324.
31. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**: 446-448.
32. Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 13-22.
33. Hayhurst, A., Happe, S., Mabry ,R., Koch, Z., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2003) Isolation and expression of recombinant antibody fragments to the biological warfare pathogen Brucella melitensis. *J Immunol Methods* **276**: 185-196.
34. Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**: 1126-1136.
35. Hummon, A.B., Lim, S.R., Difilippantonio, M.J., and Ried, T. (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* **42**: 467-470, 472.
36. Ica, T., Aydin, F., Erdenlig, S., Guler, L., and Buyukcangaz, E. (2008) Characterisation of Brucella abortus biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b. *Vet Rec* **163**: 659-661.
37. Kaufmann, S.H., and Hess, J (1999) .Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett* **65**: 81-84.
38. Khdrawi, A., A. Naoufi, A. Al-Mariri, M.Quider & A.Abaddy, (2010) Isolation of different types of nanobody-displaying phage capable of distinguishing between the most two important species of Brucella (B.melitensis AND B.abortus) in Syria. *Agriculture science magazine* **1** (3): 185-192.
39. Kirchhofer, A., Helma, J., Schmidthals, K., Frauer, C., Cui, S., Karcher, A., Pellis, M., Muyldermans ,S., Casas-Delucchi, C.S., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., Hopfner, K.P., and Rothbauer, U. (2010) Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 133-138.
40. Kruger, C., A. Hultberg, *et al.* (2006) Therapeutic effect of llama derived VHH fragments against Streptococcus mutans on the development of dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 732-7
41. Laurent, T.C., Mertens, P., Dierick, J.F., Letesson, J.J ,.Lambert, C., and De Bolle, X. (2004) Functional, molecular and structural characterisation of five anti-Brucella LPS mAb. *Mol Immunol* **40**: 1237-1247.
42. Lin, J., and Ficht, T.A. (1995) Protein synthesis in Brucella abortus induced during macrophage infection .*Infect Immun* **63**: 1409-1414.
43. Lohse, P.A., and Wright, M.C. (2001) In vitro protein display in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**: 198-204.
44. Maass, D.R., Sepulveda, J., Pernthaner, A., and Shoemaker, C.B. (2007) Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* **324**: 13-25.

45. Mayfield, J.E., Bricker, B.J., Godfrey, H., Crosby, R.M., Knight, D.J., Halling, S.M., Balinsky, D., and Tabatabai, L.B. (1988) The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic Brucella abortus protein. *Gene* **63**: 1-9.
46. Mellors, R.C. (1968) The application of labeled antibody technics in studying cell antigens. *Cancer Res* **28**: 1372-1381.
47. Moreno, E. (2002) Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* **90**: 31-38.
48. Muyldermans, S., Cambillau, C., and Wyns, L. (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci* **26**: 230-235.
49. Muyldermans, S., Baral, T.N., Retamozzo, V.C., De Baetselier, P., De Genst, E., Kinne, J., Leonhardt, H., Magez, S., Nguyen, V.K., Revets, H., Rothbauer, U., Stijlemans, B., Tillib, S., Wernery, U., Wyns, L., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., and Saerens, D. (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* **128**: 178-183.
50. Naoufi, A., A. Khdrawi, A. Al-Mariri, A. Mourad & A.Abaddy, (2010) Applying nanobody phage display technology to distinguish between Brucella and Yersinia lipopolysacchariedes. *Agriculture science magazine* **1** (3): 177-184.
51. Nielsen, K. (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* **90**: 447-459.
52. Refai, M. (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* **90**: 81-110.
53. Revets, H ,.De Baetselier, P., and Muyldermans, S. (2005) Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* **5**: 111-124.
54. Rodi, D.J., Makowski, L., and Kay, B.K. (2002) One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 92-96.
55. Roovers, R.C., Laeremans, T., Huang, L., De Taeye, S., Verkleij, A.J., Revets, H., de Haard, H.J., and van Bergen en Henegouwen, P.M. (2007) Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. *Cancer Immunol Immunother* **56**: 303-317.
56. Russel, M. (1995) Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol* **3**: 223-228.
57. Russel, M., Linderoth, N.A., and Sali, A. (1997) Filamentous phage assembly : variation on a protein export theme. *Gene* **192**: 23-32.
58. Ryckaert, S., Pardon, E., Steyaert, J., and Callewaert, N. (2009) Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of Pichia pastoris. *J Biotechnol* **145**: 93-98.
59. Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2004) Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J Biol Chem* **279**: 51965-51972.
60. Saerens, D., Ghassabeh, G.H., and Muyldermans, S. (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **8**: 600-608.
61. Scott, J.K., and Smith, G.P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386-390.

62. Sirmatel, F., Turker, M., and Bozkurt, A.I. (2002) [Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis]. *Mikrobiyol Bul* **36**: 161-167.
63. Smith, G.P., and Scott, J.K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* **217**: 228-257.
64. Smith, G.P., and Petrenko, V.A. (1997) Phage Display. *Chem Rev* **97**: 391-410.
65. Soderlind, E., Carlsson, R., Borrebaeck, C.A., and Ohlin, M. (2001) The immune diversity in a test tube--non-immunised antibody libraries and functional variability in defined protein scaffolds. *Comb Chem High Throughput Screen* **4**: 409-416.
66. Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Van Xong, H., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., De Baetselier, P., Muyldermans, S., and Magez, S. (2004) Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* **279**: 1256-1261.
67. van der Vaart, J.M., Pant ,N., Wolvers, D., Bezemer, S., Hermans, P.W., Bellamy, K., Sarker, S.A., van der Logt, C.P., Svensson, L., Verrips, C.T., Hammarstrom, L., and van Klinken, B.J. (2006) Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine* **24**: 4130-4137.
68. Warren, D.J., Bjerner, J., Paus, E., Bormer, O.P., and Nustad, K. (2005) Use of an in vivo biotinylated single-chain antibody as capture reagent in an immunometric assay to decrease the incidence of interference from heterophilic antibodies. *Clin Chem* **51**: 830-838.
69. Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M ,.Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**: 157-174.
70. Weynants, V., Tibor, A., Denoel, P.A., Saegerman, C., Godfroid, J., Thiange, P., and Letesson, J.J. (1996) Infection of cattle with Yersinia enterocolitica O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol* **48**: 101-112.
71. Wisdom, G.B. (1994 (Enzyme and biotin labeling of antibody. *Methods Mol Biol* **32**: 433-440.
72. Zhan, Y., and Cheers, C. (1995) Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to Brucella abortus infection. *Infect Immun* **63**: 1387-1390.